Aus dem Institut für Physiologische Chemie,
Lehrstuhl I,
der Universität Düsseldorf,
Direktor: Prof. Dr. Siegfried Hollmann

In vivo Untersuchungen über altersbedingte Veränderungen der Ribonukleinsäure- und Proteinsynthese in der Leber der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät in Düsseldorf vorgelegt
von

Erich Schneider
aus Holzwickede

~~1980~~
1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0024

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Lehrstuhl I, der
Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. Siegfried Hollmann

In vivo Untersuchungen über altersbedingte Veränderungen der Ribonukleinsäure- und Proteinsynthese in der Leber der Ratte.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät in Düsseldorf vorgelegt

von
Erich Schneider
aus
Holzwickede
198o

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf.

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Hollmann

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Reinauer

INHALTSVERZEICHNIS

		SEITE
1.	EINLEITUNG	8
2.	ZIEL DER ARBEIT	13
3.	BIOSYNTHESE DER PROTEINE	14
3.1.	TRANSKRIPTION	15
3.2.	TRANSLATION	21
3.2.1.	AKTIVIERUNG DER AMINOSÄUREN	22
3.2.2.	INITIATION	24
3.2.3.	ELONGATION	24
3.2.4.	TERMINATION	25
4.	MATERIAL UND METHODEN	27
4.1.	MATERIAL	27
4.1.1.	CHEMIKALIEN	27
4.1.2.	RADIOCHEMIKALIEN	27
4.1.3.	VERSUCHSTIERE	29

		SEITE
5.	METHODEN	30
5.1.	INHIBITION VON RNasen	30
5.2.	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEIN UND RIBONUKLEINSÄURE	31
5.2.1.	VORBEHANDLUNG DER TIERE	31
5.2.2.	HERSTELLUNG DES ZELLHOMOGENATES	33
5.2.3.	ZELLFRAKTIONIERUNG DURCH DIFFERENTIALZENTRIFUGATION	34
5.2.4.	QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG	36
5.2.4.1.	PRINZIP	36
5.2.4.2.	ISOLIERUNG DES PROTEINS	37
5.2.4.3.	QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY	38
5.2.4.4.	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DES PROTEINS	39
5.3.	QUANTITATIVE RIBONUKLEINSÄURE - BESTIMMUNG	40
5.3.1.	PRINZIP	40
5.3.2.	ISOLIERUNG UND PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER RIBONUKLEINSÄURE	42

		SEITE
5.3.3.	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER RIBONUKLEINSÄURE	43
5.4.	MESSUNG DER RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE	43
5.4.1.	ISOLIERUNG DER MIKROSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE	43
5.4.1.1.	PRINZIP	43
5.4.1.2.	LÖSUNGEN	44
5.4.1.3.	DURCHFÜHRUNG DER METHODE	45
5.4.1.4.	AUSWERTUNG	46
5.4.2.	POLYACRYLAMIDGEL - ELEKTROPHORESE DER RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE	47
5.4.2.1.	PRINZIP	47
5.4.2.2.	LÖSUNGEN	49
5.4.2.3.	HERSTELLUNG DER GELE	50
5.4.2.4.	ELEKTROPHORESELAUF	50
5.4.3.	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER 18 S UND 28 S RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE	51
5.4.3.1.	PHOTOMETRISCHE AUSWERTUNG DER GELE	51

		SEITE
5.4.3.2.	DURCHFÜHRUNG DER BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN DER 18 S UND 28 S RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE	53
5.5.	MESSUNG DER PROTEINSYNTHESE AN DEN POLYSOMEN	54
5.5.1.	ERMITTLUNG DES POLYSOMENPROFILS	54
5.5.1.1.	PRINZIP	54
5.5.1.2.	DURCHFÜHRUNG DER METHODE	55
6.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	57
7.	ERGEBNISSE	58
7.1.	LEBERGEWICHT UND ANTEIL DES LEBERGEWICHTES AM KÖRPERGEWICHT	59
7.2.	PROTEINGEHALT	60
7.2.1.	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DES PROTEINS	61
7.2.2.	VERTEILUNG VON MONOSOMEN/DISOMEN UND POLYSOMEN	62
7.2.3.	PROTEINGEHALT UND SPEZIFISCHE AKTIVITÄT DES PROTEINS DER POLYSOMEN	64
7.3.	RIBONUKLEINSÄURE - GEHALT	65

SEITE

7.3.1. SPEZIFISCHE AKTIVITÄT DER GESAMT-RIBONUKLEINSÄURE 66

7.3.2. VERTEILUNG UND SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN VON 18 S UND 28 S RIBOSOMALER RIBONUKLEINSÄURE 67

7.4. VERHÄLTNIS VON RIBONUKLEINSÄURE ZU PROTEIN 69

8. DISKUSSION 70

9. ZUSAMMENFASSUNG 75

10. LITERATURVERZEICHNIS 77

ABKÜRZUNGEN

ATP	:	Adenosintriphosphat
a-tRNA	:	Aminoacyl-transfer-Ribonukleinsäure
Ci	:	Curie
cpm	:	Counts pro Minute
DNA	:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	:	Äthylendiamintetra - acetat
EF	:	Elongationsfaktor
GTP	:	Guanosintriphosphat
IF	:	Initiationsfaktor
mRNA	:	Messenger Ribonukleinsäure
PPO	:	2,5 - Diphenyloxazol
POPOP	:	1,4 - di - 2 - (5 - phenyloxazoyl) - benzol
PP	:	Pyrophosphat
RNA	:	Ribonukleinsäure
RNasen	:	Ribonukleasen

S : Svedberg- Einheit

SDC : Natriumdesoxycholat

SDS : Natriumdodecylsulfat

TEMED : N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin

TRIS : 2 - Amino - 2 - hydroxymethylpropan - 1,3 - diol

tRNA : transfer Ribonukleinsäure

UDP : Uridindiphosphat

upm : Umdrehungen pro Minute

UTP : Uridintriphosphat

1. EINLEITUNG

Alter scheint in einem Verlust der Anpassungsfähigkeit und in einer progressiven Abnahme der Fähigkeit des Individuums, die Homöostase aufrecht zu erhalten, zu bestehen (Comfort, 1968 [5]). Die funktionellen Leistungsfähigkeiten der Organe und Gewebe eines Individuums pflegensich im Alter zu vermindern. Verbunden mit dieser Veränderung der funktionellen Kapazität sind Veränderungen im Zellgehalt und in der Proliferationskapazität vieler Gewebe (Buetow, 1952 [3]), sowie Änderungen in zellulären und subzellulären Strukturen und Funktionen (Andrew, 1952 [1]). Die Frage nach dem warum wir und die höheren Tiere altern ist nicht unbedeutend, da viele andere Organismen, wie z.B. Einzeller und einige höhere Pflanzen praktisch unbegrenzt leben und sich fortpflanzen. Auch die Lebensdauer der verschiedenen Tierspezies schwankt sehr erheblich (Rosenbauer, 1969 [33]; Hagedorn u. Wehner, 1974 [9]). So beträgt die mittlere Lebenserwartung der Ratte etwa 3 Jahre, die der Katze 1o Jahre, des Pferdes 4o - 5o Jahre, des Elefanten 1oo Jahre und der Riesenschildkröte gar etwa 3oo Jahre. Darüberhinaus weisen aber auch die Alterungsvorgänge in einzelnen Geweben und Organen von Säugetieren deutliche Unterschiede auf. Es ist daher verständlich, daß die Erforschung der Ursachen des Alterns auf Grund der Komplexität dieses Vorganges recht kompliziert ist und daß die Ergebnisse vielfältig und auch oft widersprüchlich sind. Die Sammlung der Fakten bezüglich des Alterns auf allen Ebenen (molekular, zellulär, Gewebe, Organe) und die Erforschung der

genetischen und morphogenetischen Kontrolle der Lebensspanne und Alterungsgeschwindigkeit, ebenso wie Experimente über den Einfluß von Umweltfaktoren (exogene Ursachen) auf den Alterungsprozeß und vergleichende Studien von speziesspezifischen Alterungsmustern machten klar, daß das Altern ein multiformer Prozeß ist. Aus diesem Grunde ist eine universelle und einfache Erklärung für das Altern wahrscheinlich unmöglich. Es gibt wohl kaum ein zweites Gebiet der biologischen Forschung, auf dem eine so große Zahl von Theorien aufgestellt wurde wie in der Gerontologie. Bisher ist es aber nicht gelungen, mit irgendeiner dieser Theorien über die Ursache des Alterns alle Alterungsphänomene zu erklären. Die Verbesserung der Methodik verschiedener naturwissenschaftlicher Schwerpunkte führte dazu, daß sich der Schwerpunkt der gerontologischen Forschung vom Gebiet der Pathologie und Physiologie auf die Molekularbiologie und Genetik verlagerte. Die verschiedenen Gesichtspunkte der einzelnen Forschungsrichtungen führte natürlich auch zu völlig unterschiedlichen Theorien des Alterns. Im Zentrum der meisten Theorien des Alterns stehen jedoch die Nukleinsäuren, die die genetische Information in allen Zellen codieren und auf die sich alle Veränderungen während des Alterns zurückführen lassen.

Im Mittelpunkt der Forschung stehen heute zwei Haupttheorien:

1. die Programmtheorie
2. die Fehlertheorie.

Beide Gruppen von Theorien betrachten Altern als einen langsamen Verlust und eine Entartung der Information, die durch Makromoleküle repräsentiert wird.

Nach der Programmtheorie wird das Altern gleich allen anderen Entwicklungsphasen des Organismus durch ein spezifisches genetisches Programm gesteuert. Diese Theorie ist besonders durch HAYFLICK (1973) [13] klar dargestellt worden. Alterung ist entweder durch "Alterungsgene", die erst spät im Leben zur Wirkung kommen würden, oder durch die Blockierung der im Erwachsenenalter aktiven Gene programmiert. Argumente für diese Theorie liefern zwei Gruppen von Beobachtungen: in vivo gibt es biologische Uhren, was z.B. in der Physiologie von Pubertät und Menopause gezeigt wurde; in vitro ist die Fähigkeit von diploiden Fibroblasten zur Proliferation begrenzt und für eine gegebene Spezies relativ konstant - grundlegende Arbeiten hierzu leisteten HAYFLICK und MOORHEAD [12,14] . Normale Zellen haben eine definierte Lebensspanne, entsprechend der Tierspezies von der sie stammen. So zeigen Fibroblastenkulturen aus normalem menschlichen fetalen Gewebe etwa 5o Populationsverdopplungen.

Die Fehlertheorie besagt, daß es bei der DNA - Replikation und den Transkriptions - und Translationsprozessen zu Fehlern kommt, die sich während der Entwicklung des Individuums akkumulieren und schließlich einen Umfang erreichen, bei dem dann der Tod eintritt.

Neben anderen möglichen Ursachen des Alterns bietet sich die Hypothese an, daß im Alter die Proteinbiosynthese, einschließlich der Enzymsynthese, qualitativ verändert und quantitativ vermindert ist. Seit man die Grundzüge der Biosynthese der Proteine kennt, stellt man sich vor, daß infolge irgenwelcher Veränderungen in der DNA - Matrize oder der von dieser geprägten RNA im Alter veränderte Proteine mit einer verminderten Leistungsfähigkeit produziert werden. Medvedev (1961) [25] entwickelte als erster die Hypothese, daß "Kopierfehler" der Grund des Alterns seien. Unter der Voraussetzung, daß die DNA gegenüber unterschiedlichen Störungen durch eine Vielzahl von Repair - Systemen (die den komplementären intakten Strang verwenden) geschützt ist, nahm er an, daß dieser Reparaturvorgang unmöglich ist, wenn Irrtümer in einem einzelnen RNA - Strang und während der Proteinbiosynthese erfolgen.Medevedev nahm daher an, daß die Einzelstrang-RNA bei der Übertragung der DNA-Information - vertreten durch die mRNA, rRNA und tRNA - empfindlicher gegenüber äußeren Einwirkungen reagiert als die DNA selbst. Störungen können aber nicht nur auf der Stufe der DNA und RNA, sondern auch direkt bei der Proteinbiosynthese auftreten. ORGEL [29] entwickelte 1963 einen hypothetischen Mechanismus zur Erklärung des zellulären Alterns, der in der gerontologischen Forschung große Bedeutung erlangte. Er ging von der These aus, daß die Fähigkeit der Zelle, funktionelle Proteine zu synthetisieren, nicht allein von der korrekten Codierung der Primärstruktur der Polypeptidketten durch die

Gene, sondern auch von der Zuverlässigkeit des gesamten Synthese-Mechanismus abhängt. Eine Störung in der Genauigkeit der Proteinbiosynthese könnte auf der Ebene der mRNA/tRNA stattfinden oder direkt Folge einer gestörten RNA - Synthese sein. Entstehen im Rahmen einer fehlerhaften Synthese defekte Enzyme mit reduzierter Spezifität, die ihrerseits wieder direkt an der DNA-, RNA- oder Proteinbiosynthese beteiligt sind, so kann es zu einer Anreicherung von defekten Makromolekülen kommen. Als Folge davon kommt es zunächst zu einer reversiblen Schädigung der betroffenen Zellen. Da solche Prozesse kumulierend wirken, kann es dann beim Überschreiten eines gewissen Wertes zur "Fehlerkatastrophe" und damit zu einer irreversiblen Schädigung und letztlich zum Tod der Zellen kommen.

Am Schluß dieser Einleitung sei noch auf folgende Schwierigkeit bei der Erforschung von Altersveränderungen hingewiesen: Kalendarisches und biologisches Altern sind nicht immer korreliert. Eine sich ergebende Diskrepanz wird durch genetische Faktoren und besonders auch durch Umwelteinflüsse hervorgerufen. Exogene Faktoren (z.B. Ernährung, Krankheit, radioaktive Strahlung etc.) können den Alterungsprozeß außerordentlich beeinflussen.

2. ZIEL DER ARBEIT

Der Proteinmetabolismus scheint im Alter von fundamentaler Bedeutung zu sein. Es ist jedoch wenig bekannt über die Beziehung der Proteinbiosynthese und den Alterungsprozessen. Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, von der ORGEL'schen Theorie ausgehend, mögliche altersbedingte Veränderungen im System der Proteinbiosynthese zu erforschen.
Folgende Komponenten des proteinsynthetisierenden Apparates, die beim Alterungsprozeß verändert werden könnten, sollen untersucht werden:

a) Die Menge und das Verhältnis von Gesamtzell-RNA und Protein
b) Die Biosynthese von Gesamtzell-RNA und Protein
c) Die Biosynthese und Struktur der 18 S und 28 S rRNA
d) Das Verteilungsmuster von Monosomen und Polysomen
e) Die Proteinsyntheseleistung an den Polysomen.

Alle Versuche sollen i n v i v o vergleichend an der Leber ausgewachsener junger und alter Ratten durchgeführt werden. Da die Leber eine bedeutende Rolle in der Proteinsynthese spielt, wurde sie für die Studie ausgewählt.

3. BIOSYNTHESE DER PROTEINE

Um einerseits die Vielzahl der möglichen Störungen bei der Proteinbiosynthese zu zeigen und andererseits die Bedeutung und das Zusammenwirken der untersuchten Makromoleküle in diesem System deutlich werden zu lassen, soll im folgenden Teil die Biosynthese der Proteine kurz erläutert werden.

Jede Zelle ist darauf angewiesen, den Bestand ihrer Proteine ständig zu erneuern, da die Proteinmoleküle nur eine begrenzte Lebensdauer haben. Um den Stoffwechsel aufrechterhalten zu können, müssen z.B. neue Enzymmoleküle synthetisiert werden, während die alten Moleküle abgebaut werden. Bei der Proteinbiosynthese wird die Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Strang in die Reihenfolge von Aminosäuren eines Polypetidstranges übersetzt. Die komplizierten Vorgänge dieser Übertragung laufen schrittweise ab und können in funktionelle Phasen unterteilt werden.

A.TRANSKRIPTION

Durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase werden an einem der beiden Stränge der DNA-Doppelhelix entsprechend der Basenpaarungsregel die RNA-Moleküle aufgebaut. Die entstandenen RNA-Moleküle haben zunächst noch nicht ihre funktionsfähige Form, sondern sie werden nach der Synthese im Zellkern bzw. Zytoplasma verkürzt und in die translationsfähige Form gebracht (processing).

B.TRANSLATION

Die Biosynthese der Proteine aus Aminosäuren erfolgt im Zytoplasma an den Polysomen. Sie sind die funktionelle

Einheit der Proteinbiosynthese. Die Polysomen sind Aggregate aus wenigen bis vielen Monosomen, die gewissermassen perlschnurartig an einem mRNA-Strang aufgereiht sind. Die mRNA trägt in ihrer Basensequenz jene genetische Information verschlüsselt, die bei der Transkription kopiert wurde und nun an den Ribosomen in die Proteinsequenz übersetzt wird. Die notwendigen Aminosäuren werden durch tRNA an die Ribosomen herangebracht.
Im folgenden soll der Mechanismus, der während der beiden Phasen abläuft, kurz skizziert werden:

3.1. TRANSKRIPTION

Die Umsetzung der in der DNA gespeicherten Information in eine RNA mit definierter Basenfolge verläuft nach dem Prinzip des Watson-Crick-Mechanismus, indem die RNA-Sequenz durch Paarung komplementärer Basen bestimmt wird. Die dabei synthetisierte RNA ist komplementär zu der DNA-Matrize. Das Enzym, an dem diese Synthese abläuft, ist die DNA-abhängige RNA-Polymerase. Sie transkribiert dabei nur einen der beiden Stränge einer DNA-Doppelhelix und bildet so eine einsträngige RNA. Bei diesem Prozeß bleibt die DNA in ihrer Struktur erhalten, lediglich zum Abgreifen des codogenen Stranges ist eine vorübergehende lokale Denaturierung durch Trennung der DNA-Basen in einem kleinen Bereich des Doppelstranges erforderlich. Da die RNA Uracil anstelle von Thymin enthält, wird beim Abgreifen der DNA-Matrize Adenin mit Uracil gepaart. Bei der Synthese der RNA werden nach der Basenpaarungsregel Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil in das Molekül eingebaut.

Daneben kommen aber auch andere Basen, häufig modifizierte Standardbasen, vor. Die für die enzymatische RNA-Synthese benötigten Nukleotide müssen in aktivierter Form als Ribosidtriphosphate vorliegen. Die RNA-Polymerase benötigt zur Aktivierung die Gegenwart von Mg^{2+} oder Mn^{2+} - Ionen. Der Reaktionsablauf läßt sich zusammenfassend folgendermassen beschreiben:

$$n_1ATP + n_2UTP + n_3CTP + n_4GTP \xrightarrow[\text{(DNA-Matrize)}]{Mg^{2+}/\text{RNA-Polymerase}} \text{RNA - 5'- PPP} + (n_1+n_2+n_3+n_4)\text{-1 PP}$$

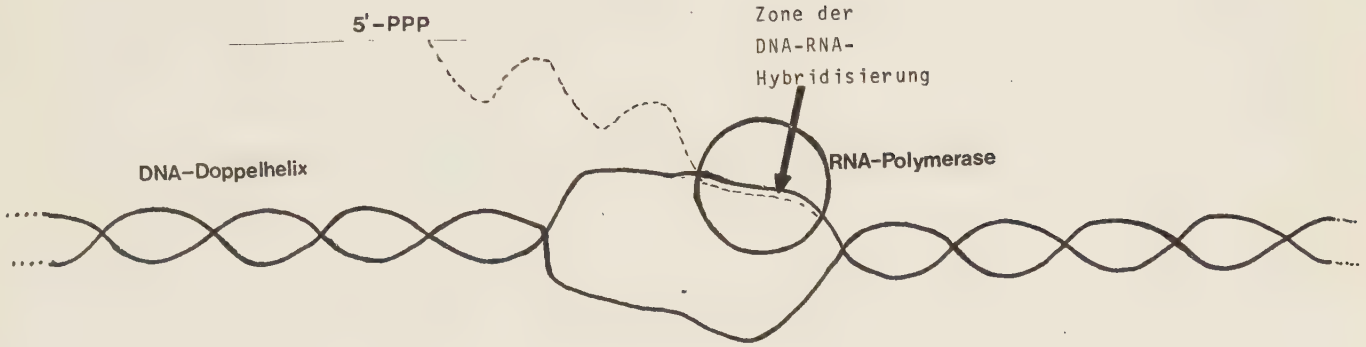
Das neu entstehende RNA-Molekül wächst in 5' ⟶ 3' Richtung, also antiparallel zum codogenen DNA-Strang. Die nukleare RNA-Polymerase aus Säugetierzellen setzt sich aus zwei großen und mehreren kleineren Untereinheiten zusammen, die das "core" - Enzym bilden, welches für das Auffinden des korrekten Startpunktes auf der DNA-Matrize noch den sigma(σ)- Faktor (saures Protein) benötigt. Sigma-Faktor und core-Enzym bilden zusammen das Holo-Enzym. Alle Zellkerne von eukaryotischen Zellen enthalten mindestens zwei verschiedene RNA-Polymerasearten, eine ist im Nukleolus lokalisiert und für die ribosomale-RNA-Synthese verantwortlich, die andere findet sich im Nukleoplasma und besorgt die Bildung der nichtribosomalen RNA.
Der Ablauf der RNA-Synthese wurde vor allem im zellfreien System aus E.coli - Bakterien untersucht. Für Eukaryonten ist der prinzipielle Ablauf der RNA-Synthese wohl der gleiche:

Das "core" - Enzym wird unspezifisch und reversibel an die DNA gebunden. Nach Anlagerung des Sigma-Faktors kommt es dann zur endgültigen Bindung an die spezifische Initiationsstelle der DNA-Matrize, hierbei wird auch zugleich der codogene Strang erkannt. Nach Anlagerung des ersten Nukleosidtriphosphates (ATP o. GTP) kommt es zur Kettenverlängerung (Elongation), die in 5' ⟶ 3' - Richtung erfolgt. Das erste Nukleotid bleibt stets als Triphosphat erhalten. Mit Beginn der Kettenverlängerung dissoziiert der Sigma-Faktor vom Holo-Enzym ab und die weitere RNA-Synthese, mit Fortbewegung der RNA-Polymerase (Translokation), wird nur durch das "core"-Enzym durchgeführt. Die Verlängerung des RNA-Moleküls erfolgt solange, bis die Polymerase auf der DNA-Matrize ein Signal zur Termination der Kette erreicht. Zur Freisetzung der RNA scheint ein weiteres spezifisches Protein (Rho-Faktor) benötigt zu werden.

Zur Anpassung an die jeweiligen Bedürfnisse der Zelle und an ihre spezifische funktionelle Aufgabe muß die RNA-Synthese quantitativ und qualitativ gesteuert werden. Obwohl die wichtigsten Mechanismen der Regulation bei Prokaryonten bekannt sind, ist unser Wissen über die Regulation der Transkription bei eukaryotischen Organismen noch ziemlich gering. Die hierzu notwendigen Regelmechanismen sind bei Eukaryonten sehr viel komplexer als bei den viel einfacher aufgebauten Prokaryonten.

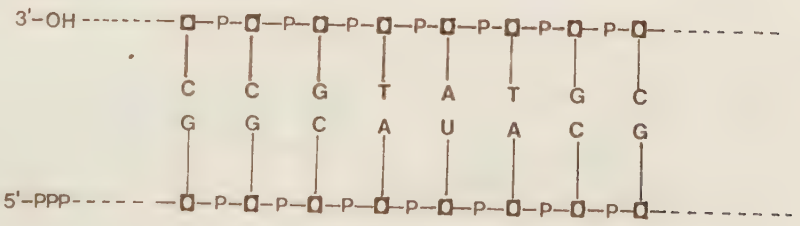
Die primären Genprodukte bei der Transkription sind noch keine funktionsfähigen Ribonukleinsäuren, sondern sehr viel höhermolekulare RNA-Moleküle. Im Zellkern oder nach dem Übertritt ins Zytoplasma werden sie einer enzymatischen Modifikation (processing) unterworfen und in ihre funktionsfähige Form als mRNA, rRNA und tRNA gebracht.

Schema zur Wirkungsweise der DNA - abhängigen RNA - Polymerase



Auf Grund der lokalen Denaturierung kommt es zur Ausbildung einer "Transkriptionsblase", welche das DNA-Molekül durchläuft.

Art der Basenpaarung beim Abgreifen des codogenen DNA-Stranges



3.2. TRANSLATION

Die Biosynthese der Proteine aus Aminosäuren erfolgt im Zytoplasma an den Ribosomen.
Die R i b o s o m e n sind Partikel aus Ribonukleinsäure und Proteinen, welche bei Eukaryonten frei im Zytoplasma oder gebunden an die Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums vorkommen. Ihr Durchmesser beträgt 2o - 22 nm und ihr Sedimentationskoeffizient etwa 8o S. Jedes Ribosom setzt sich aus je einer größeren und einer kleineren Untereinheit zusammen. Die Strukturerhaltung der Ribosomen erfordert eine bestimmte Mg^{2+} - Konzentration (~1omM), bei Verringerung der Mg^{2+} - Konzentration dissoziieren sie in ihre Untereinheiten. Die Ribosomenuntereinheiten werden durch ihre Sedimentationskoeffizienten gekennzeichnet, in tierischen Zellen betragen sie 4o S und 6o S. Zusammen mit einer größeren Anzahl von Proteinen enthält die 4o S - Untereinheit eine 18 S - rRNA und die 6o S - Untereinheit je ein Molekül 5 S, 5,8 S und 28 S - rRNA. Bei der Proteinsynthese wird je eine 4o S - und 6o S - Untereinheit zu einem funktionsfähigen Ribosom mit dem Sedimentationskoeffizienten von 8o S zusammengeschlossen. Während der Proteinsynthese sind mehrere Ribosomen durch ein mRNA-Molekül zu einem Polysom verknüpft.

Bei der Proteinsynthese wirken mRNA, tRNA und Ribosom zusammen, um die genetische Information, die bei der Transkription kopiert wurde, in die entsprechende Peptidsequenz zu übersetzen. Man kann den Vorgang der Translation in folgende Teilschritte unterteilen:

3.2.1. AKTIVIERUNG DER AMINOSÄUREN

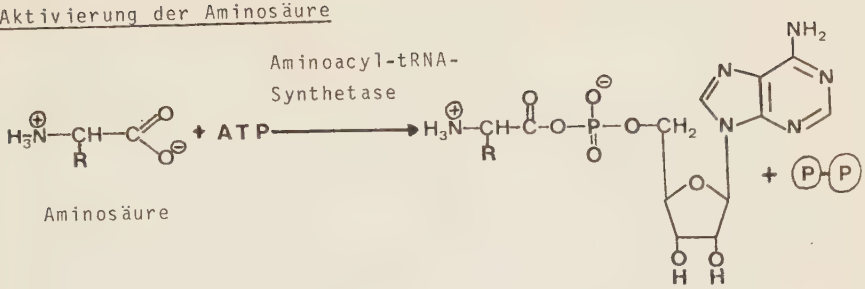
Bevor die freien Aminosäuren am Ribosom zu Polypeptiden verknüpft werden können, müssen sie enzymatisch an eine für die betreffende Aminosäure spezifische tRNA gebunden werden. Dies geschieht in einer vom Ribosom unabhängigen Zweischrittreaktion, bei der ATP und die Gegenwart von Mg^{2+} - Ionen benötigt werden. Im ersten Schritt wird die Aminosäure mittels ATP zu einem Aminoacyl-adenylat aktiviert, im zweiten Schritt folgt die Veresterung der Aminoacyl-Gruppe über die 3' - OH-Gruppe des terminalen Adenosins einer spezifischen tRNA zur Aminoacyl-tRNA (a-tRNA):

$$\text{Aminosäure} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Aminoacyl-adenylsäure} + \text{PP} \qquad (1)$$

$$\text{Aminoacyl-adenylsäure} + \text{tRNA} \longrightarrow \text{Aminoacyl-tRNA} + \text{Adenylsäure} \qquad (2)$$

Beide Reaktionsschritte werden von dem gleichen Enzym, der Aminoacyl-tRNA-Synthetase (tRNA-Ligase) katalysiert, das hinsichtlich Aminosäure und tRNA hochspezifisch ist. Für eine korrekte Proteinsynthese muß sie daher in zweifacher Hinsicht präzise funktionieren: Erkennung ihrer spezifischen Aminosäure und der dazugehörenden spezifischen tRNA.

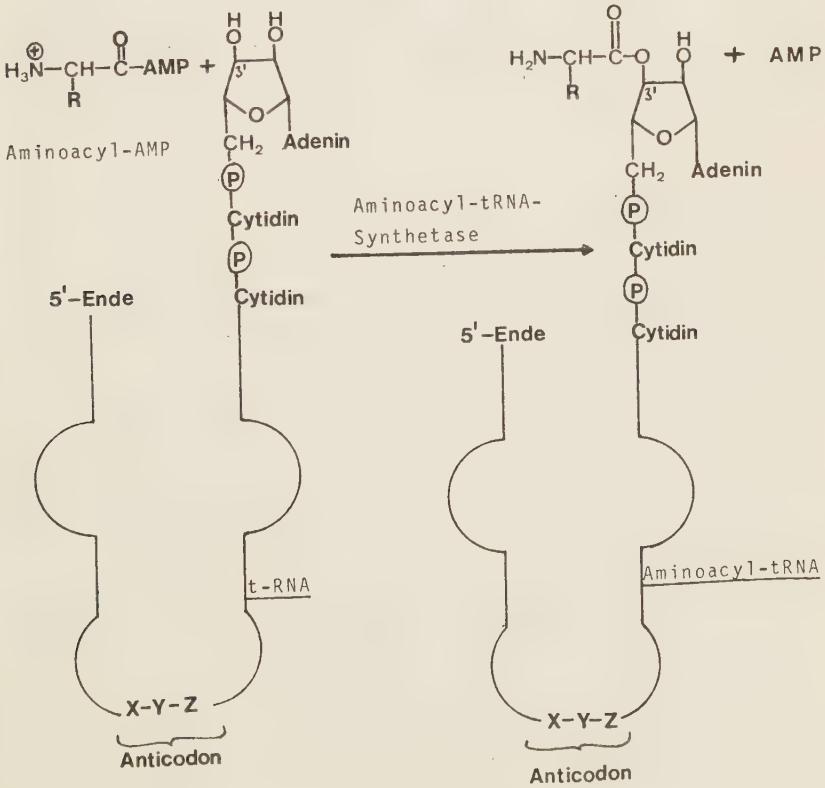
1. Aktivierung der Aminosäure



Aminosäure

Aminoacyl-AMP

2. Übertragung auf die für die Aminosäure spezifische t-RNA



3.2.2. INITIATION

Für den Start der Proteinbiosynthese werden spezifische Proteine, die Initiationsfaktoren, benötigt.
In Eukaryonten wird die Synthese aller Proteine mit der Aminosäure Methionin gestartet, die durch das Start-Codon AUG codiert wird. Bei der Initiation der Proteinsynthese bildet der Initiationsfaktor IF-MP mit Met-tRNA und der 4o S - Ribosomenuntereinheit den Startkomplex, dabei wird GTP zur Energielieferung hydrolysiert.
Der Faktor IF-M1 bindet die mRNA im Bereich des Codon AUG an diesen Komplex. Der Startkomplex wird dann mittels der Faktoren IF-M2A, IF-M2B und IF-M3 mit einer 6o S - Ribosomenuntereinheit verbunden, so daß der 8o S - Komplex entsteht.

3.2.3. ELONGATION

Nach Ausbildung des fertigen Initiationskomplexes kann an dem betreffenden Ribosom die Polypeptidsynthese beginnen. Bei der Verlängerung der Polypeptidkette lassen sich drei Phasen unterscheiden: (1) die Anlagerung einer Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstelle des Ribosoms (Codon-Erkennung), (2) die Bildung einer Peptidbindung unter Freigabe der deacylierten tRNA und (3) das Weiterrücken des Ribosoms zum nächsten Codon (Translokation). Für die Elongation werden ebenfalls GTP und einige spezifische Proteine (Elongationsfaktoren) benötigt. Jedes Ribosom hat zwei Bindungsstellen für tRNA-Moleküle, die mit A (= Aminoacyl) bzw. P (= Peptidyl) bezeichnet werden.

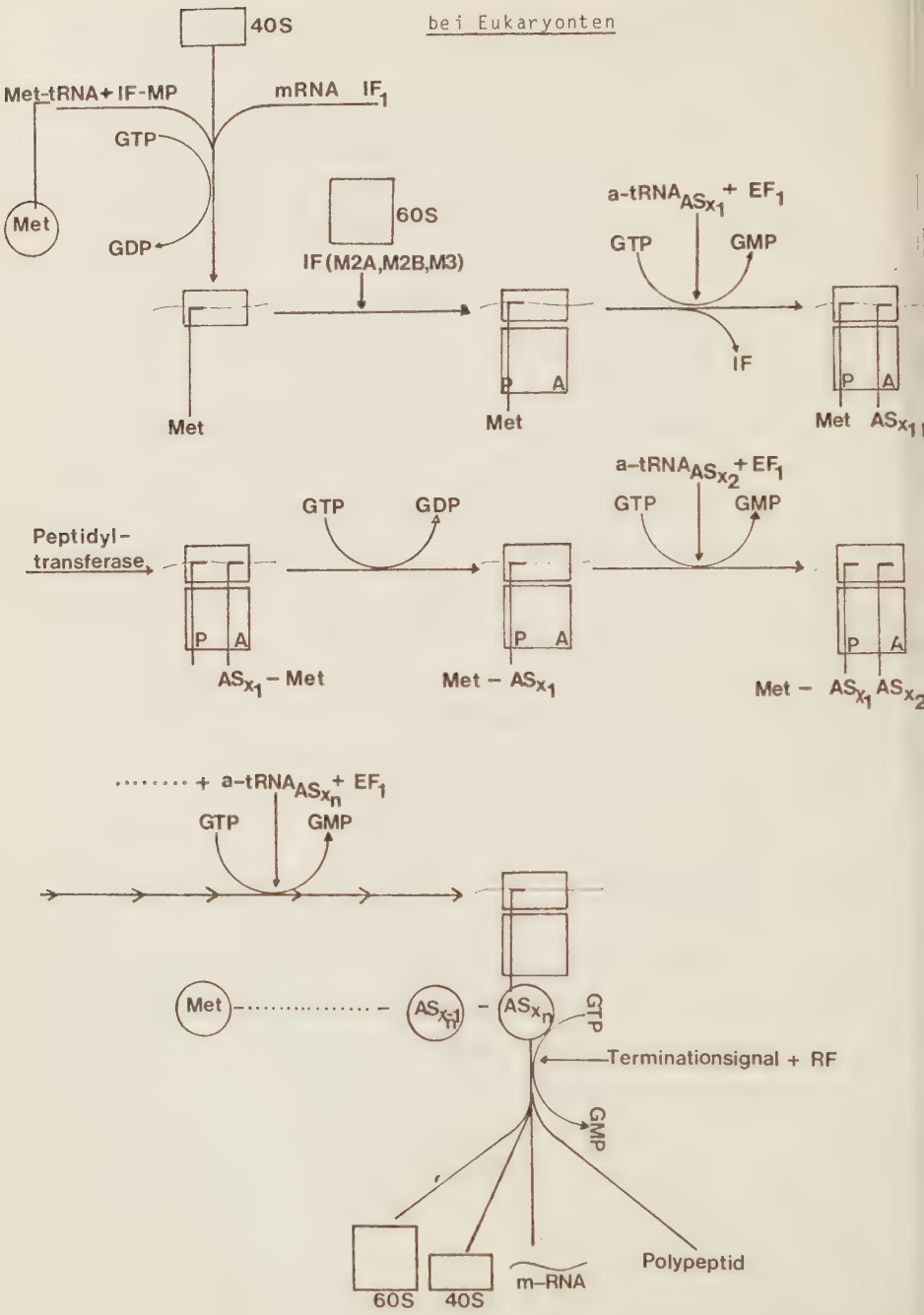
Zunächst wird eine dem Initiator folgende zum neuen Codon passende Aminoacyl-tRNA unter Beteiligung von GTP und dem Elongationsfaktor EF1 an die A-site gebunden. Durch das Enzym Peptidyltransferase wird die Esterbindung der an der P-site liegenden Met-tRNA gespalten und die Carboxyl-Gruppe des Methionin geht mit der NH_2 - Gruppe der folgenden Aminosäure eine Peptidbindung ein. Das so entstandene Dipeptid bleibt über die Carboxyl-Gruppe der zweiten Aminosäure mit deren tRNA verbunden. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung der deacylierten tRNA und damit zur Freigabe der P-site. Bei der sich nun anschließenden Translokation, die ebenfalls GTP benötigt, rückt das Ribosom um 3 Nucleotide weiter vor, wobei zugleich die entstandene Peptidyl-tRNA von der A-site zur P-site verschoben wird. Die A-site wird damit frei zur Aufnahme der nächsten (codonspezifischen) Aminoacyl-tRNA.
Durch Wiederholung der beschriebenen Elongationsvorgänge kommt es solange zur Verlängerung der Polypeptidkette, bis die gesamte Information der mRNA in eine entsprechende Aminosäuresequenz eines Polypeptids übersetzt wurde.

3.2.4. TERMINATION

Für Eukaryonten ist es bisher nicht bekannt, durch welche Faktoren die letzte Phase der Proteinbiosynthese, nämlich die Beendigung der Elongation und die Freisetzung der synthetisierten Polypeptidkette, erfolgt.

Schema zur Translation

bei Eukaryonten



4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. MATERIAL

4.1.1. CHEMIKALIEN

Es wurden folgende Chemikalien benutzt:

Bentonit - SF (Serva GmbH., Heidelberg)

Saccharose, RNase frei (Serva GmbH., Heidelberg)

Triton X-1oo (Serva GmbH., Heidelberg)

Natriumdodecylsulfat (Serva GmbH., Heidelberg)

N, N' - Methylenbisacrylamid (Serva GmbH., Heidelberg)

N, N, N', N' - Tetramethyläthylendiamin (Serva GmbH., Heidelberg)

Dithioerythrit (Sigma, München)

Precinorm S (Boehringer, Mannheim)

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen und hatten p.A. Qualität.

4.1.2. RADIOCHEMIKALIEN (Isotope und Szintillator)

6 - ^{14}C - Orotsäure (59mCi/mmol) (Amersham Buchler Braunschweig)

D,L - 4,5 - ^{3}H - Leucin (3omCi/mmol) (Amersham Buchler Braunschweig)

2,5 - Diphenyloxazol (PPO) (Koch-Light-Laboratories Colnbrook Bucks England)

1,4 - di - 2 - (5-phenyloxazoyl) - benzol (POPOP) (Koch-Light-Laboratories Colnbrook Bucks England)

SZINTILLATORLÖSUNG

Für die Szintillationsmessungen wurde die folgende Szintillatorflüssigkeit verwendet (PATTERSON und GREENE [3o]):

Zusammensetzung:

2500 ml Toluol
1333 ml Triton X - 100 (behandelt s.u.)
168 ml Liquifluor NEN (s.u.)

nach dem Mischen wird die Flüssigkeit im Dunkeln im Kühlraum aufbewahrt.

REINIGUNG VON TRITON X-100:

Ungefähr 6 Liter Triton und 500 g Kieselgel 40 (Merck 0,2 - 0,5 mm) werden in einer entsprechenden Plastikflasche mehrmals täglich geschüttelt. Nach 3 - 7 Tagen kann durch ein Glaswollefilter filtriert werden. Das Filtrierte Triton ist dann brauchbar für den Szintillator.

HERSTELLUNG VON LIQUIFLUOR NEN:

Liquifluor besteht aus einem PPO/POPOP Konzentrat in Toluol. Es wird nach folgender Angabe hergestellt:

100 g PPO und 1,25 g POPOP in 1 l Toluol.

4.1.3. VERSUCHSTIERE

Die in allen Experimenten benutzten Tiere waren weibliche Wistar II - Ratten aus selbstaufgebauter Alterskolonie. Sie wurden unter kontrollierten Bedingungen (12stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, 23°C, 7o% relative Luftfeuchtigkeit) in Gruppen bis zu fünf Tieren in einem Makrolon-Käfig in einem besonderen Raum gehalten. Die Ratten bekamen Standardfutter für Ratten der ALTROMIN GmbH. (Lage) und Trinkwasser ad libitum. Alle Tiere wurden regelmäßig betreffs ihres Allgemeinbefindens und besonders nach Symptomen respiratorischer Infektionen untersucht. Es wurde darauf geachtet, nur gesunde Tiere zu benutzen. Einige weibliche Ratten dieses Stammes entwickeln im Alter vor allem subcutane Tumoren und Mammatumoren.
Die Ratten dieses Stammes haben nach Angaben des Zentralinstituts für Versuchstiere (Hannover) eine 5o% Überlebensrate von 24 Monaten und eine maximale Lebenszeit von ungefähr 4o Monaten. Zu den gleichen Daten kam auch GSELL [8] bei der Ermittlung von Überlebenskurven von Wistar-Ratten.

5. METHODEN

5.1. INHIBITION VON RNasen

Die makromolekularen Ribonukleinsäuren werden während des Zellaufschlusses und der Isolierung leicht in kleinere Moleküle gespalten, die veränderte physikalische Eigenschaften haben und biologisch inaktiv sind. Neben mechanischen Kräften, die vor allem Einfluß auf die hochmolekularen Ribonukleinsäuren haben, stellen RNasen die Hauptgefahr bei der RNA-Gewinnung dar. Hinsichtlich ihrer Wirkungsmechanismen sind die Ribonukleasen Phosphodiesterasen, welche in der Lage sind, Internukleotidbindungen an enzymspezifischen Stellen zu spalten. Da z.B. bei der 28 S rRNA über 4ooo dieser Bindungen vorliegen, ist leicht verständlich, daß selbst geringe Enzymaktivitäten große Wirkung haben können. Zudem sind RNasen, die mit einem Molekulargewicht von etwa 13ooo die kleinsten bekannten Enzyme sind, äußerst widerstandsfähig gegen extreme Bedingungen: so entfalten sie ihre Wirkung noch bei $0^{o}C$ relativ gut, vertragen andererseits aber auch Temperaturen bis zu $1oo^{o}C$ ohne zu denaturieren. Folgende RNasen können bei der Isolierung der RNA stören:

1. zelleigene RNasen, die bei der Zerstörung der Zellkompartimentierung während der Aufarbeitung freigesetzt werden
2. mikrobielle RNasen
3. menschliche RNasen, die bei Berührung übertragen werden.

Diese verschiedenen RNasen sind durch ihre unterschiedlichen

pH - Optima in einem weiten pH-Bereich aktiv.

Eine Inhibierung der RNasen kann durch Zusatz von Detergentien (z.B. Natriumdodecylsulfat) oder Adsorbentien (z.B. Bentonit) zu den Lösungen erreicht werden. Um eine Kontaminierung durch RNasen zu verhindern oder bei der Aufarbeitung freiwerdende RNasen zu inhibieren, wurden bei der Präparation alle Gefäße und Geräte nach Möglichkeit sterilisiert oder aber mit Bentonit ($Al_2O_3 \times 4SiO_2 \times H_2O$, bindet basisches Protein wie z.B. RNasen) behandelt und die verwendeten Lösungen autoklaviert oder durch Membranfilter filtriert. Während der Präparation wurde möglichst schnell und stets mit Handschuhen gearbeitet.

5.2. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEIN UND RIBONUKLEINSÄURE

5.2.1. VORBEHANDLUNG DER TIERE

Folgender Puffer wurde bei der Aufarbeitung verwendet:

Puffer A:

o,o6 M TRIS/HCL pH 8,5

o,o8 M KCL

o,oo75 M $MgCL_2$

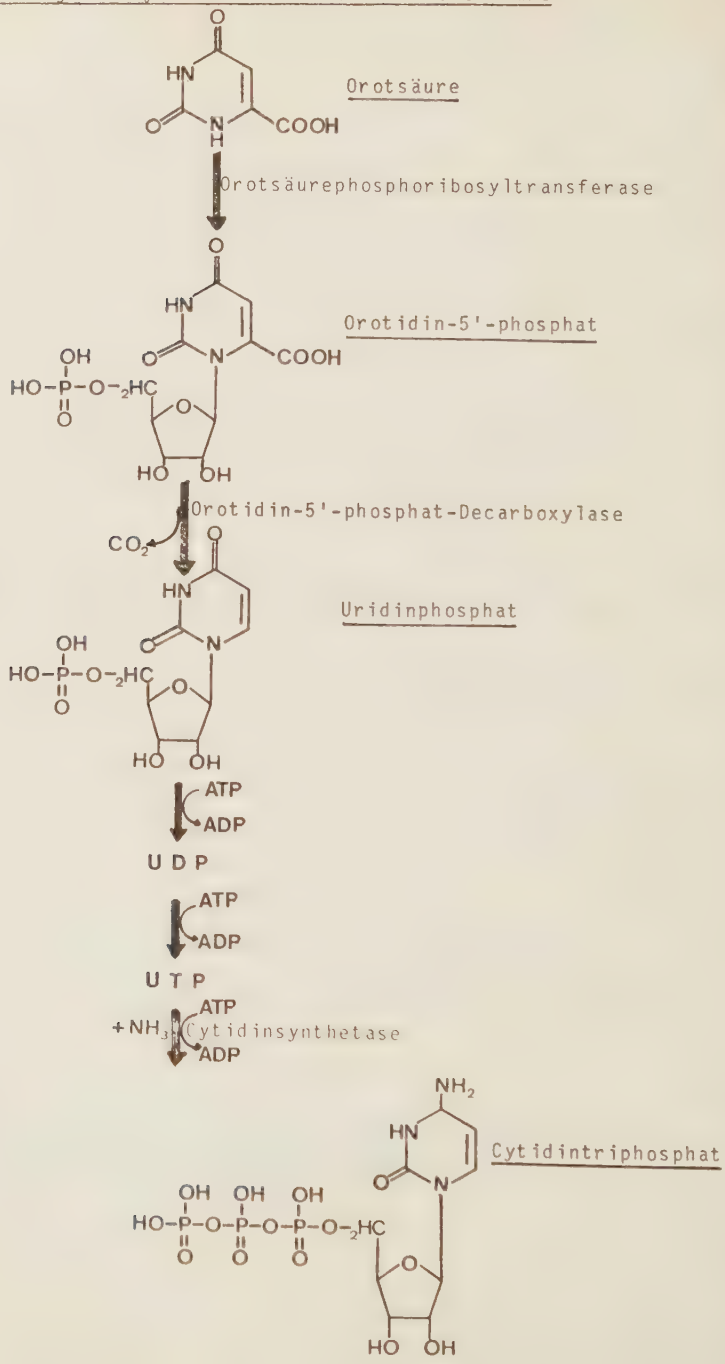
o,12 M Sucrose (RNase frei)

o,2 % Bentonit

o,oo1 M Dithioerythrit

16 Stunden vor ihrer Dekapitierung wurde den Wistar II - Ratten ^{14}C - Orotsäure (25 µCi/1oo g Körpergewicht) i.p.

Syntheseweg der Pyrimidinnukleotide aus Orotsäure



injiziert. Nach dieser Zeit hat die radioaktive Markierung der zytoplasmatischen RNA ihr Maximum. Vom Zeitpunkt der Injektion an wurden die Ratten mit Trinkwasser ad libitum, jedoch ohne Futter gehalten, um den Glykogengehalt der Leber stark zu reduzieren und damit die Isolierung der ribosomalen RNA zu verbessern. 3o Minuten vor der Dekapitierung erhielten die Rattenweibchen D,L - 4,5 - ^{3}H-Leucin (65µCi/1oo g Körpergewicht)i.p. injiziert, da nach dieser Zeit das Maximum der radioaktiven Markierung des Proteins zu finden ist. Die Tiere wurden dann stets zur gleichen Tageszeit (9^{00} - $1o^{00}$) durch Dekapitieren mit der Guillotine getötet, um tageszeitliche Variationen auszuschalten. Nach dem Entbluten wurden die Lebern schnell entnommen und in eiskaltem Puffer A bis zur weiteren Aufarbeitung für kurze Zeit aufbewahrt. Die getöteten Tiere wurden auf makroskopisch-sichtbare Veränderungen an Geweben und Organen hin untersucht und bei erkennbaren Erkrankungen vom weiteren Versuch ausgeschlossen.

Alle weiteren Aufarbeitungsschritte der Leber wurden bei 4^{o} C durchgeführt.

5.2.2. HERSTELLUNG DES ZELLHOMOGENATES

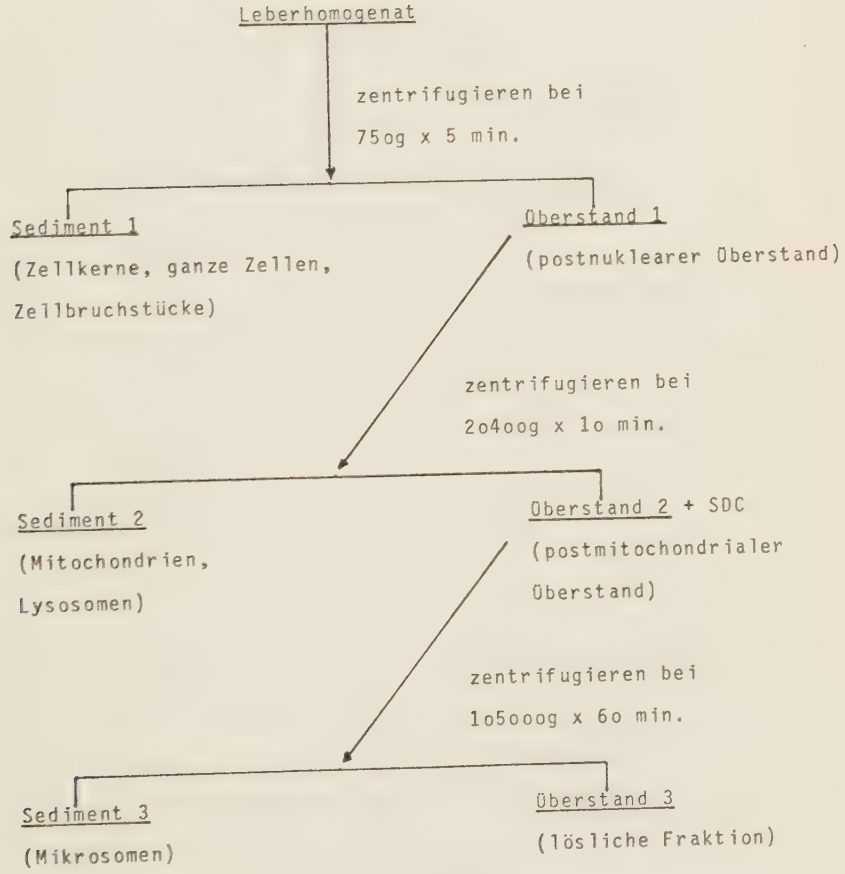
Die frisch entnommene Leber wurde zunächst mit eiskaltem Puffer A abgespült und von anhängendem Fett befreit. An-

schließend wurde sie kurz zwischen Filterpapier abgetrocknet und dann gewogen. Die für die vorgesehenen Bestimmungen benutzten Leberstücke wurden mit der Rasierklinge zerschnitten und in 8 Volumen Puffer A durch sechs Kolbenhübe bei 1ooo Upm im Glas - Teflon - Homogenisator homogenisiert. Die Einzelhomogenate von je drei Lebern einer Altersgruppe wurden vereinigt und o,5 % an Triton X - 1oo gemacht. Durch mehrfaches vorsichtiges Kippen des Meßzylinders wurde gemischt und anschließend die Zellfraktionierung durch Differentialzentrifugation durchgeführt.

5.2.3. ZELLFRAKTIONIERUNG DURCH DIFFERENTIALZENTRIFUGATION

Die vereinigten Einzelhomogenate werden fünf Minuten bei 25oo Upm mit einem SS 34 Rotor in einer Sorvall RC - 2B Kühlzentrifuge zentrifugiert, um Kerne, sowie Gewebe- und Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde dann nochmals zehn Minuten lang bei 13ooo Upm und 4°C zur Abtrennung der Mitochondrien und Lysosomen zentrifugiert. Der postmitochondriale Überstand wurde vorsichtig abgenommen und o,5 % an Natriumdesoxycholat gemacht und unter gelegentlichem vorsichtigen Kippen des Meßzylinders 15 Minuten stehengelassen, zur Ablösung der Ribosomen vom endoplasmatischen Retikulum. Ein Teil des postmitochondrialen Überstandes wird aufbewahrt zur Ermittlung des Polysomenprofils, der übrige Teil wird zur Gewinnung der Mikrosomen (Ribosomen und Teile des endoplasmatischen Retikulums) 6o Minuten lang bei 4oooo Upm und 4°C in einem Festwinkelrotor 5o Ti in einer BECKMAN präparativen Ultrazentrifuge SPINCO L2 - 65B zentrifugiert.

Schema der durchgeführten Fraktionierung von Rattenleber-homogenat in verschiedene subzelluläre Fraktionen



Das Sediment (Mikrosomen) wurde anschließend sofort weiter aufgearbeitet zur Gewinnung der mikrosomalen Ribonukleinsäure (Phenolextraktion) s. Abschnitt 5.4.

5.2.4. QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG

5.2.4.1. PRINZIP

Vor der photometrischen Gehaltsbestimmung müssen alle störenden Substanzen aus der Lösung beseitigt werden. Dazu werden die zur Bestimmung eingesetzten Aliquote des Homogenates und der subzellulären Fraktionen zunächst mit kalter Perchlorsäure versetzt. Dadurch wird das Protein denaturiert und fällt gemeinsam mit DNA und RNA aus. Nach Zentrifugation wird das Sediment mit Trichloressigsäure erhitzt, dabei werden DNA und RNA hydrolytisch gespalten und vollständig gelöst. Nach Abkühlung wird das Protein durch zentrifugieren sedimentiert. Zur Entfernung der anhaftenden Lipide wird das proteinhaltige Sediment mehrmals mit einem Äthanol/Äther-Gemisch extrahiert. Danach wird das sedimentierte, lipidfreie Protein in Natronlauge in der Wärme gelöst. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird ein Aliquot zur Proteinbestimmung nach LOWRY [21] eingesetzt. Bei dieser Bestimmung wird eine der Proteinkonzentration proportionale Blaufärbung der Testlösung gemessen. Die Färbung beruht a) auf der Reaktion der Peptidbindungen mit Kupfer in alkalischer Lösung (Biuret) und b) auf der Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenz durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin.

Ein anderer Teil der Lösung wird zur Bestimmung der spezifischen Aktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

5.2.4.2. ISOLIERUNG DES PROTEINS

Je o,5 ml des Homogenates und der verschiedenen subzellulären Fraktionen werden mit 2 ml eiskalter o,3 N - Perchlorsäurelösung gut gemischt und dann 1o Minuten lang bei 3ooo Upm zentrifugiert. Das Sediment wird in gleicher Weise noch einmal behandelt. Anschließend wird das Sediment in 2 ml 5%iger Trichloressigsäurelösung 15 Minuten lang bei 9o°C unter gelegentlichem Schütteln erhitzt. Nachdem die Lösung dann 5 Minuten im Eisbad gekühlt wurde, wird zentrifugiert (1o Minuten lang bei 3ooo Upm) und das Sediment zweimal mit je 2 ml 5% Trichloressigsäurelösung gewaschen und 1o Minuten lang bei 3ooo Upm zentrifugiert. Dann wird das Sediment mit 2 ml 8o% Äthanol und zweimal mit je 2 ml eines Äthanol/Äther-Gemisches (1:1)extrahiert. Zwischen den Extraktionen wird 1o Minuten lang bei 3ooo Upm abzentrifugiert. Zuletzt wird das Sediment in 2 ml 1N - Natronlaugelösung aufgenommen und mindestens 3o Minuten lang bei 6o°C unter gelegentlichem Schütteln bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird diese Lösung zur quantitativen Proteinbestimmung eingesetzt. Für die Messung der Radioaktivität wird ebenfalls ein Teil dieser Lösung verwendet.

5.2.4.3. QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY [21]

REAGENZIEN:

1. alkalisches Kupfer-Tartrat-Reagenz

Lösung A: 4o g Na_2CO_3 in 5oo ml o,1N - NaOH-Lösung

Lösung B: o,5 g $CuSO_4$ $5H_2O$

1,o g K - Na - tartrat

gelöst in 1oo ml o,1N - NaOH-Lösung

Das alkalische Kupfer - Tartrat - Reagenz besteht aus 5o ml der Lösung A und 1 ml der Lösung B. Die Mischung wird erst kurz vor dem Versuch angesetzt.

2. Folin - Ciocalteu - Reagenz

Durch Verdünnung mit Aqua dest. ist das gekaufte Reagenz auf 1N Säure eingestellt worden.

3. Kontrollserum Precinorm S

Precinorm S ist ein Krontrollserum auf Rinderserumalbumin-basis.

4. 1N - Natronlauge

5. o,5N - Natronlauge

o,5 ml der obigen Proteinlösung werden mit o,5 ml Aqua dest. gemischt und die Lösung 1:5 mit o,5 N - Natronlauge verdünnt. o,5 ml dieser Verdünnung werden mit 2,5 ml Kupfer-Tartrat-Reagenz gemischt. Nach 1o Minuten bei

Raumtemperatur werden o,5 ml Folin - Ciocalteu - Reagenz hinzugegeben, sofort gemischt und nach 3o Minuten bei Raumtemperatur wird die Extinktion der Lösung bei 578 nm gegen einen Leerwert am Eppendorf - Photometer gemessen. Zur Ermittlung des Leerwertes werden o,5 ml der o,5N - Natronlauge in gleicher Weise mit Kupfer-Tartrat-Reagenz und Folin-Ciocalteu-Reagenz behandelt. Mit dem aus der Differenz von Hauptwert - Leerwert errechneten Extinktionswert kann dann aus einer mit Precinorm S aufgestellten Eichkurve der Gehalt an Protein abgelesen werden.

5.2.4.4. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DES PROTEINS

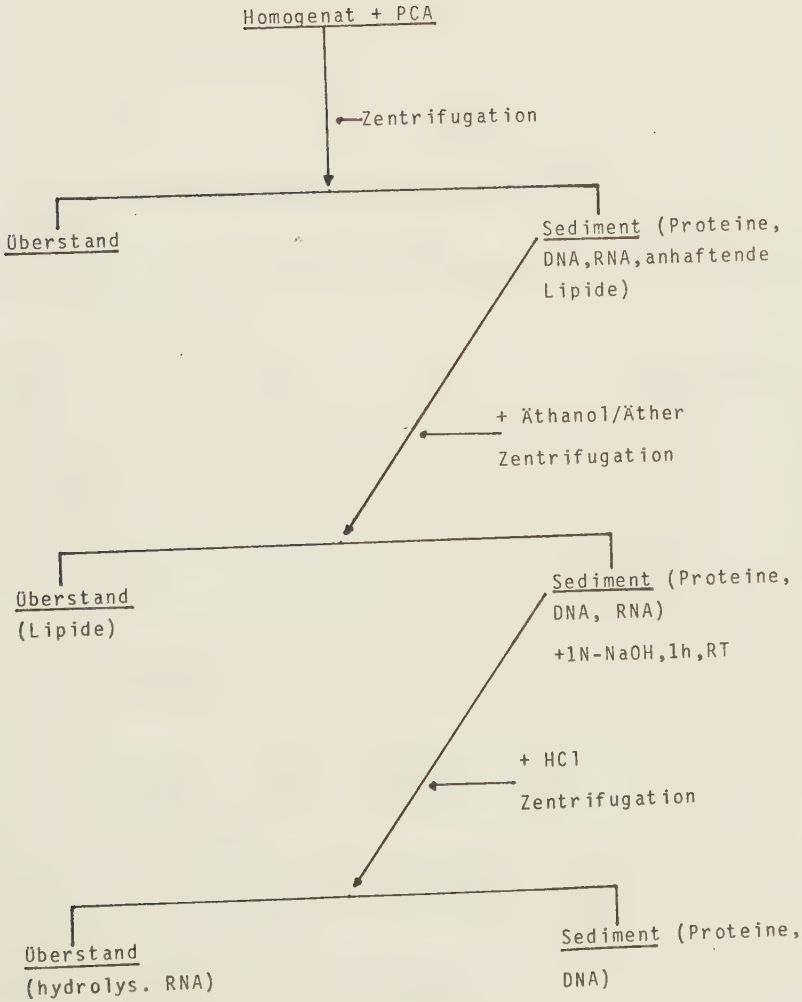
Die Radioaktivität des ^{3}H - Leucin-markierten Gesamtproteins wird in einem Aliqout der obigen Proteinlösung unter Verwendung einer Szintillatorlösung nach PATTERSON im Packard Flüssigkeitszintillationszähler gemessen. Aus dem Gesamtproteingehalt und den dazugehörigen Zahlraten wird dann die spezifische Aktivität errechnet.

5.3. QUANTITATIVE RIBONUKLEINSÄURE - BESTIMMUNG

5.3.1. PRINZIP

Niedermolekulare Verbindungen wie z.B. freie Nukleotide, Kohlenhydrate, anorganisches Phosphat oder auch organische Phosphatverbindungen mit niedrigem Molekülgewicht können die Bestimmung der Nukleinsäuren stören und müssen deshalb vor der quantitativen Messung abgetrennt werden. Zur Beseitigung dieser störenden Substanzen werden die zu bestimmenden Aliquote des Homogenates und der subzellulären Fraktionen mit kalter Perchlorsäure behandelt, dabei fallen Nukleinsäuren, Proteine und mit ihnen vergesellschaftete Lipide aus. Zur Abtrennung der anhaftenden Lipide werden die sedimentierten Makromoleküle mehrmals mit Äthanol/Äther extrahiert. Vor der photometrischen quantitativen Bestimmung der Ribonukleinsäuren werden die Lipidfreien Rückstände mit Natronlauge bei Raumtemperatur behandelt. Hierdurch erfolgt eine Hydrolyse der Ribonukleinsäuren in nicht mehr säurepräzipitierbare Produkte. Desoxyribonukleinsäure und Proteine werden unter diesen Bedingungen nicht gespalten und werden nach ansäuern der Lösung mit Salzsäure durch Zentrifugation wieder sedimentiert. Aus dem Überstand wird die Ribonukleinsäure quantitativ durch Absorptionsmessung bei 26o nm und 28o nm bestimmt und ihre Radioaktivität im Flüssigkeitszintillationszähler gemessen.

Schema zur Isolierung und photometrischen Bestimmung der Ribonukleinsäure.



5.3.2. ISOLIERUNG UND PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER RIBONUKLEINSÄURE (SCOTT et al.) [35]

Jeweils o,5 ml Aliquote des Homogenates und der subzellulären Fraktionen werden zweimal mit je 2 ml o,3 N - Perchlorsäure gut gemischt und 1o Minuten lang bei 3ooo Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wird dann mit 2 ml eiskaltem 8o% Äthanol gemischt und 1o Minuten bei 3ooo Upm zentrifugiert. Danach wird das Sediment viermal mit je 2 ml eiskaltem Äthanol/Äther - Gemisch (1:2) extrahiert. Schließlich wird das Sediment mit 2 ml 1N - Natronlauge gut gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln stehengelassen. Hiernach wird der Ansatz mit o,4 ml 6N - Salzsäure angesäuert und fünf Minuten lang im Eisbad gekühlt. Nach anschließender 1o Minuten langer Zentrifugation bei 3ooo Upm wird der Überstand vorsichtig abgegossen. Das Sediment wird mit 1 ml 1N - Salzsäure erneut extrahiert und die Lösung wie zuvor zentrifugiert. Die vereinigten Lösungen werden filtriert und die Extinktion bei 26o nm und 28o nm im BECKMAN Spektralphotometer Acta III gemessen.

Der Gehalt an Ribonukleinsäure wird aus den gemessenen Extinktionen E_{26o} und E_{28o} nach einer von TSANEV und MARKOV genannten Formel berechnet:

$$\mu g\ RNA/o,5ml = \frac{(E_{26o} - E_{28o}) \times \text{Verdünnung} \times 3,4}{o,oo472}$$

5.3.3. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER RIBONUKLEINSÄURE

1oo µl der filtrierten Ribonukleinsäurelösung wurden im Szintillationsgläschen mit 5 ml Szintillationslösung gemischt und die Zählrate im PACKARD Tricarb Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Hieraus wurde die spezifische Aktivität pro 1 µg Ribonukleinsäure berechnet.

5.4. MESSUNG DER RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE

5.4.1. ISOLIERUNG DER MIKROSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE

5.4.1.1. PRINZIP

Nach 6o Minuten Zentrifugation bei 1o5ooo g bei $4^{o}C$ erhält man als Sediment die Mikrosomenfraktion. Sie besteht aus Ribosomen und Teilen des endoplasmatischen Retikulums. Die Ribosomen sind sphärische Teilchen, die sich aus Ribonukleinsäuren und verschiedenen ribosomalen Proteinen zusammensetzen. Die Isolierung der ribosomalen Ribonukleinsäure aus der mikrosomalen Fraktion erfolgt durch Phenolextraktion. Durch die konzentrierte Phenollösung werden die Proteine denaturiert und reichern sich während der Zentrifugation als schmale Grenzschicht an, zwischen einer phenolischen Unterphase und einer wässrigen Oberphase, die ribosomale Ribonukleinsäure enthält.

5.4.1.2. LÖSUNGEN

1. Puffergesättigte Phenollösung (PERRY [31])

Phenol p.A.
Hydroxychinolin
Acetat-Puffer (o,o1 M Natriumacetat/NaOH pH 6,o
o,1 M NaCL
o,oo1 M Äthylendiamintetraessigsäure
Dinatriumsalz (Dihydrat))

Im Wasserbad werden die 25o g Phenol in der braungefärbten Originalflasche unter leichtem Schütteln auf 37°C erwärmt. Wenn die Phenolkristalle dann z.T. geschmolzen sind, werden 27,5 ml Acetat - Puffer zugegeben (ca. 9o % Phenollösung). Nachdem das Phenol gelöst ist, muß geprüft werden, ob die Lösung absolut farblos ist - andernfalls muß sie verworfen werden. Der farblosen Phenollösung werden nun o,25 g 8 - Hydroxychinolin zugesetzt und Puffer bis zur Sättigung hinzugegeben. Nach einiger Zeit bilden sich zwei völlig klare , gut getrennte Phasen. Diese Phenollösung ist bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt etwa zwei Monate haltbar.

2. Puffer E

o,o4 M TRIS
o,o2 M Natriumacetat
o,oo1 M Na_2 - EDTA
die Lösung wird mit Eisessig auf pH 7,2 eingestellt.

3. 2o% wässrige Natriumdodecylsulfatlösung

4. 1% Natriumchloridlösung

5.4.1.3. DURCHFÜHRUNG DER METHODE

Das nach einstündiger Zentrifugation bei 4oooo Upm (s. 5.2.3.) erhaltene Sediment (Mikrosomen) wird mit wenig Acetat - Puffer abgespült und dann in 2o ml Acetat - Puffer suspendiert. Zu dieser Suspension werden o,5 ml der 2o% Natriumdodecylsulfatlösung hinzugefügt. Danach wird diese Suspension in zwei gleiche Teile aufgeteilt und zu jedem Teil werden 1o ml Acetat-Puffer und 1o ml gesättigte Phenollösung gegeben. Anschließend werden 1o ml Chloroform zugesetzt. Das Gemisch wird dann 15 Minuten lang bei 15°C in einem Schüttelwasserbad geschüttelt. Danach wird es in Zentrifugengläser gefüllt und bei 115oo Upm fünf Minuten lang bei 15°C in einer Sorvall RC - 2B Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird mit einer Pasteurpipette abgehoben und in einem Erlenmeyer-Kolben mit 1o ml Phenollösung und 1o ml Chloroform versetzt. Zur phenolischen Unterphase werden 1o ml Acetat - Puffer, 5 ml Phenollösung und 5 ml Chloroform gegeben. Beide Gemische werden dann 15 Minuten lang bei 15°C geschüttelt und danach 5 Minuten bei 115oo Upm zentrifugiert. Die phenolischen Phasen werden verworfen. Die wässrigen Phasen werden nun so oft mit jeweils 1o ml Phenollösung und 1o ml Chloroform 15 Minuten lang bei 15°C geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei 115oo Upm und 15°C zentrifugiert, bis keine weiße Zwischenphase (Protein) mehr

erscheint. Die wässrige Oberphase wird dann zur Entfernung des Phenols mit 15 ml Chloroform versetzt und 5 Minuten bei 15°C geschüttelt. Danach wird 5 Minuten bei 11500 Upm und 15°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgehoben. Zu je 1 ml dieser Lösung werden 0,1 ml einer 1%igen NaCl-Lösung hinzugegeben. Dann wird das 2,5fache Volumen tiefgekühlten absoluten Äthanols langsam unter Umschwenken hinzugegeben. Bei - 20°C wird die Lösung über Nacht aufbewahrt und dann 20 Minuten lang bei 12000 Upm und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wird sofort vorsichtig abgegossen und die Zentrifugengläschen bei 4°C an der Luft getrocknet.

5.4.1.4. AUSWERTUNG

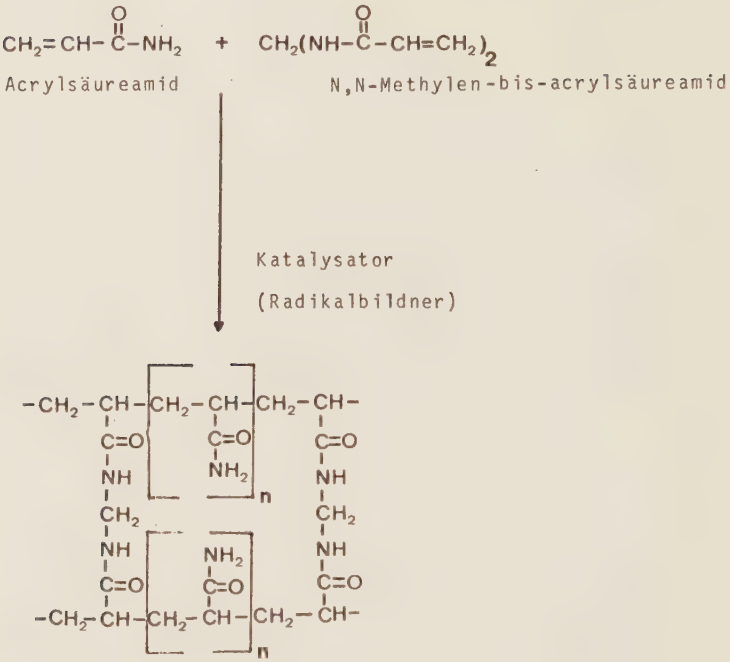
Das getrocknete Sediment (mikrosomale Ribonukleinsäure) wird in 3 ml Puffer E gelöst. Anschließend wird das gesamte Spektrum über den Wellenlängenbereich 230 nm - 350 nm aufgezeichnet. Das Spektrum der Nukleinsäuren ist gekennzeichnet durch ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und ein Minimum bei 235 nm. Aus dem RNA - Spektrum können die Extinktionen bei 235 nm, 260 nm, 280 nm abgelesen werden. Die Quotienten E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{235} geben einen Hinweis auf die Reinheit der isolierten Ribonukleinsäure. Sind sie größer als 1,8, dann gilt die RNA - Präparation als rein. Sind sie kleiner als 1,8, so kann auf eine Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Protein geschlossen werden.

5.4.2. POLYACRYLAMIDGEL - ELEKTROPHORESE DER RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE

5.4.2.1. PRINZIP

Auf Grund vieler Eigenschaften (z.B. Herstellung verschiedener Porengrößen, Verwendung mit einer großen Anzahl von Puffern, schnelle Trennung etc.) eignen sich Polyacrylamidgele besonders gut für die Trennung von Makromolekülen wie z.B. Ribonukleinsäuren. Die hydrophilen, mechanisch stabilen Gele werden aus wässrigen Lösungen von Acrylsäureamid und N,N'-Methylen-bis-acrylsäureamid als Vernetzer, katalysiert von einem Radikalbildner, kopolymerisiert. Als Katalysator verwendet man gewöhnlich Ammoniumpersulfat zusammen mit N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin (TEMED). Die Porenweite des Gels wird durch das relative Verhältnis an Acrylsäureamidmonomer und vernetzendem Reagenz bestimmt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes an das Gel wandern die auf das Gel aufgebrachten Makromoleküle (z.B. Ribonukleinsäuren) entsprechend ihrer Ladung und Molekülgröße unterschiedlich schnell und werden so nach einer gewissen Laufzeit voneinander getrennt.
Bei dem im Versuch verwendeten alkalischen Puffer haben die Ribonukleinsäuren eine negative Bruttoladung und wandern zur Anode.

Bildung des Polyacrylamidgels



5.4.2.2. LÖSUNGEN

1. Acrylamid - Stammlösung

15,oo g Acrylsäureamid (zweimal umkristallisiert aus Chloroform (LOENING [2o])

o,75 g N,N'-Methylen-bis-acrylsäureamid

mit Aqua dest. wird auf 1oo,o ml aufgefüllt.

2. Elektrophorese - Puffer (E - Puffer)

o,o4 M TRIS

o,o2 M Natriumacetat

o,oo1 M Na - EDTA

die Lösung wird o,1%ig an Natriumdodecylsulfat gemacht (um RNasen zu inhibieren) und mit Eisessig auf pH 7,2 an der Glaselektrode eingestellt

3. Ammoniumpersulfatlösung

1o%ige wässrige Lösung, frisch angesetzt.

4. N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)

5. Natriumdodecylsulfat

6. Glycerin

5.4.2.3. HERSTELLUNG DER GELE (BISHOP [2])

Für die Herstellung von 15 2,4% Gelen (9 cm hoch, Ø 5 mm) werden in einer Saugflasche 1o,75 ml Acrylamid-Stammlösung, 24,3 ml Aqua dest., 6,2 ml Glycerin und 2o,75 ml E-Puffer gemischt und mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Durch den Zusatz von Glycerin lassen sich die Gele später besser in kleine Scheibchen zerschneiden (zur Bestimmung der Radioaktivität von 18 S und 28 S rRNA). Wenn keine Luftblasen mehr aufsteigen, wird die Evakuierung beendet. Anschließend werden o,o5 ml TEMED als Polymerisationsregler und o,5 ml Ammoniumpersulfatlösung hinzugegeben und gemischt. Diese Lösung wird sofort in unten durch Gummistopfen verschlossene Röhrchen bis zu einer Höhe von 9 cm luftblasenfrei gefüllt und mit Aqua dest. überschichtet. Die gefüllten Röhrchen bleiben zur Polymerisation 3o Minuten bei Raumtemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird von der Geloberfläche das darübergeschichtete Wasser abgehoben. Dann werden die Gummistopfen entfernt und die Röhrchen unten mit einem Nylonnetz verschlossen, da die sehr weichen Gele ohne Verschluß leicht aus dem Röhrchen rutschen würden.

5.4.2.4. ELEKTROPHORESELAUF

Die fertigen Röhrchen werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wird mit E-Puffer gefüllt

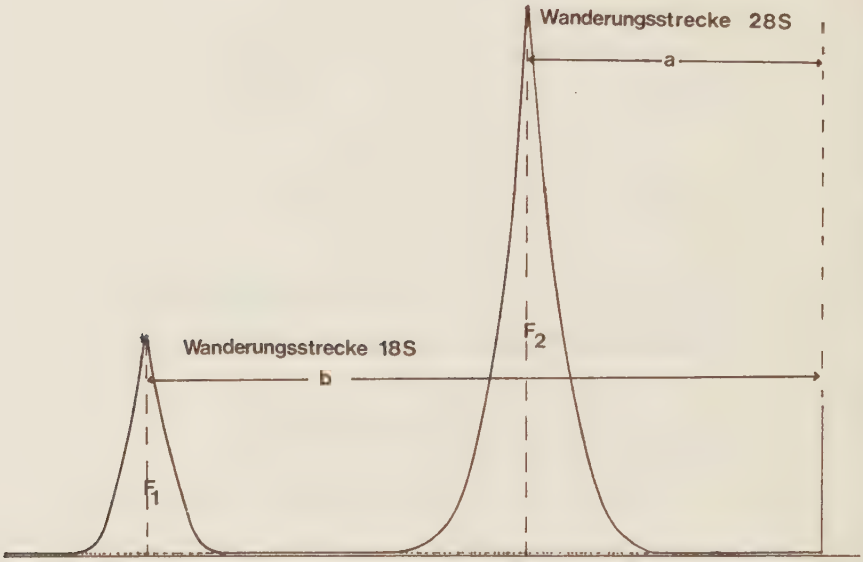
und eine Gleichstromspannung angeschlossen. Die Stromstärke beträgt 5 mA pro Gel. Um Verunreinigungen aus den Gelen zu entfernen, läßt man diese eine Stunde vorlaufen. Anschließend werden je Gel ca. 20 µg der isolierten mikrosomalen Ribonukleinsäure aufgetragen, nachdem die Probe zuvor mit dem gleichen Volumen Glycerin gemischt wurde, um eine schwere, gut sedimentierende Lösung zu erhalten. Als Nullwert dient ein Röhrchen, auf das nur E-Puffer-Glycerin-Gemisch aufgetragen wird. Nach zwei Stunden wird der Elektrophoreselauf beendet.

5.4.3. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER 18 S UND 28 S RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE

5.4.3.1. PHOTOMETRISCHE AUSWERTUNG DER GELE

Nach dem Ende der Elektrophorese wird die Absorption der Polyacrylamidgele bei 260 nm mit dem Gelscanner des BECKMAN Acta III Spektralphotometer gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet. Da die Polyacrylamidgele kein ultraviolettes Licht bei 260 nm absorbieren, können die Ribonukleinsäuren, die auf ihnen getrennt wurden, über ihre Absorption bei dieser Wellenlänge bestimmt werden. Die beiden peaks im Spektrum entsprechen der 18 S und 28 S rRNA und bei der aufgetragenen Menge an Ribonukleinsäure sind ihre Peakflächen den anteiligen Mengen proportional. Ihre Wanderungsstrecken und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtmenge können aus der Kurve ermittelt werden (siehe Abbildung)

Bestimmung der Wanderungsstrecken und der Anteile von 18S und 28S rRNA an der Gesamtmenge der getrennten Ribonukleinsäure.



$$F_1 + F_2 = 100\,\%$$

$$\%\ 18S = \frac{100\,\%}{F_1 + F_2} \cdot F_1$$

$$\%\ 28S = \frac{100\,\%}{F_1 + F_2} \cdot F_2$$

5.4.3.2. DURCHFÜHRUNG DER BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN DER 18 S UND 28 S RIBOSOMALEN RIBONUKLEINSÄURE

Zur Bestimmung der Zählrate und Berechnung der spezifischen Aktivitäten der 18 S und 28 S ribosomalen RNA werden die Gele mit einem selbstgebauten Gerät in o,8 mm dicke Scheibchen zerschnitten, nachdem sie durch Einlegen in durch Trockeneis tiefgekühltes n-Hexan hartgefroren waren. Die Scheibchen werden in verschraubbare Szintillationsgläschen gelegt und nach einer von MAHIN und LOFBERG [22] beschriebenen Methode jeweils in o,6 ml einer Lösung aus o,2 ml 6o% Perchlorsäure und o,4 ml 3o% H_2O_2 3 - 5 Stunden bei 6o°C bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 5 ml Szintillatorlösung hinzugefügt und die Zählrate im PACKARD Tricarb Szintillationszähler gezählt.

5.5. MESSUNG DER PROTEINSYNTHESE AN DEN POLYSOMEN

5.5.1. ERMITTLUNG DES POLYSOMENPROFILS

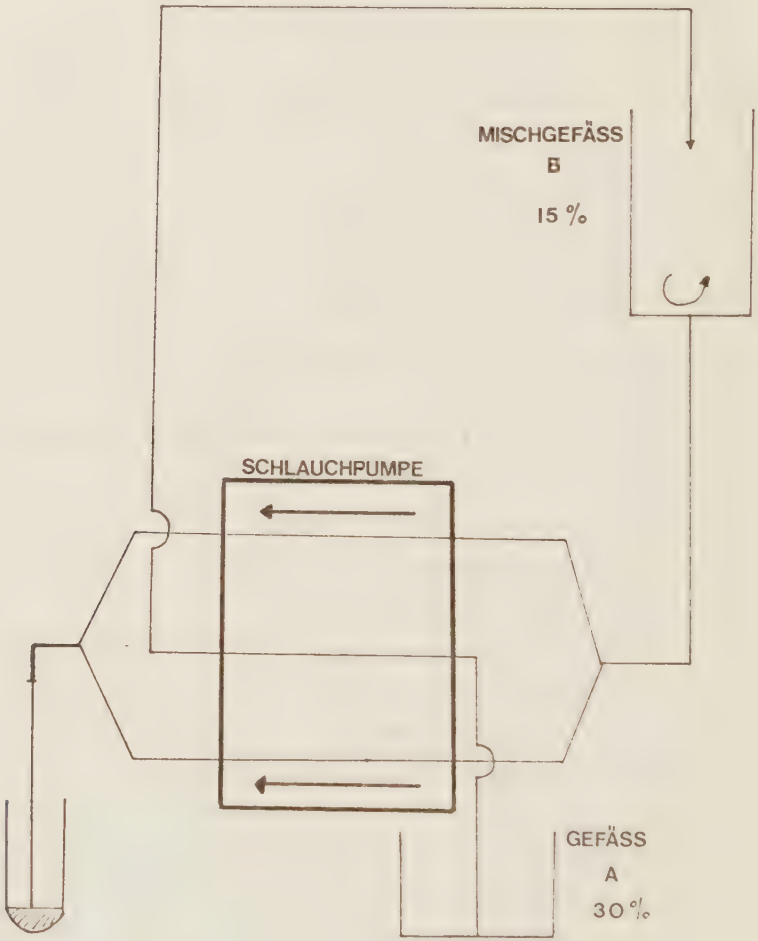
5.5.1.1. PRINZIP

Da suspendierte Ribosomen in einem starken Zentrifugalfeld die Tendenz haben zu sedimentieren, können Gemische von Monosomen und Polysomen unterschiedlicher Größe durch Zentrifugationsmethoden getrennt werden. In der Zonenzentrifugationstechnik wird die Probe mit den zu trennenden Teilchen einem kontinuierlichen Gradienten überschichtet. Häufig wird Rohrzucker in einer geeigneten Pufferlösung zur Herstellung des Gradienten benutzt. Mit Hilfe einer Mischvorrichtung wird der relativ steil verlaufende lineare Sucrosegradient vor dem Zentrifugenlauf in einem Zentrifugenröhrchen hergestellt. Die Sucrose-Konzentration des Gradienten ist dabei unten im Zentrifugenröhrchen am größten. Dieser Rohrzuckergradient wird dann mit dem aufzutrennenden Stoffgemisch überschichtet. Während des Zentrifugenlaufes wandern die Teilchen entsprechend ihrer Form und ihrem Molekulargewicht mit unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeit. Die Probe wird dann bis zur gewünschten Trennung zentrifugiert, d.h. nicht bis zur vollständigen Sedimentation, aber genügend lange, um die Teilchen durch den Gradienten wandern und diskrete Banden bilden zu lassen. Die Position der Banden wird bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der die Ribonukleinsäuren ihre maximale Absorption aufweisen, am Photometer in einer Durchflußküvette gemessen.

5.5.1.2. DURCHFÜHRUNG DER METHODE

In einem Gradientenformer (siehe Abbildung), der aus zwei Gefäßen, einer Schlauchpumpe und den notwendigen Schläuchen besteht, wird der Sucrosegradient hergestellt. Zur Inhibition von Ribonukleasen wird die gesamte Apparatur zunächst mit Bentonit, dann mit sterilem Aqua dest. durchgespült. Das Gefäß A enthält 16,5 ml 3o% Sucroselösung, das Mischgefäß B 16,5 ml 15% Sucroselösung. Durch Betätigung der Schlauchpumpe wird die 3o % Sucroselösung kontinuierlich in das Mischgefäß B gepumpt und hier mit der vorhandenen 15 % Sucroselösung gemischt (Magnetrührer). Aus dem Mischgefäß wird die Sucroselösung, deren Konzentration sich kontinuierlich erhöht, mit doppelter Geschwindigkeit abgepumpt und durch eine Kanüle geleitet , die bis zur Oberfläche einer 2 ml 2 M - Sucroselösung reicht, die zuvor in das Zentrifugenröhrchen gegeben wurde. Das 2 M - Sucrosekissen soll verhindern, daß Polysomen bis auf den Boden des Röhrchens gelangen, dort festhaften und bei der späteren photometrischen Bestimmung nicht erfaßt werden. Die Geschwindigkeit der Pumpe ist so gewählt, daß 1 ml pro Minute in das Zentrifugenröhrchen gepumpt wird. Der fertige lineare 15 % - 3o % Sucrosegradient wird über Nacht erschütterungsfrei bei $4^{o}C$ aufbewahrt. Am folgenden Tag werden nach der Aufarbeitung der Rattenleber 1,5 ml des postmitochondrialen Überstandes auf den Gradienten vorsichtig aufgetragen und 2,5 Stunden bei 25ooo Upm und $4^{o}C$

Gradientenformer zur Herstellung des linearen Dichtegradienten.



mit einem SW 27 Ausschwingrotor in einer BECKMAN Spinco L2 - 65 B Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach werden die Gradienten im BECKMAN Acta III Spektralphotometer in einer Durchflußküvette bei einer Wellenlänge von 26o nm kontinuierlich gemessen und anschließend über einen Fraktionssammler in 1 ml Fraktionen aufgeteilt.

6. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Berechnung der statistischen Größen Mittelwert, Standardabweichung s und Testgröße t (Student - t - Test) erfolgte mit dem OLIVETTI Mikrocomputer P 1o1.

7. E R G E B N I S S E

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen umfassen die Bestimmung des Leber-Feuchtgewichtes, des Anteils des Leber-Feuchtgewichtes am Gesamtkörpergewicht, die quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und der Proteinsynthese unter Benutzung von ^{3}H - Leucin als precursor im Homogenat und subzellulären Fraktionen, die Bestimmung des Gesamt-RNA-Gehaltes und der Gesamt-RNA-Synthese unter Benutzung von ^{14}C - Orotsäure als Vorstufe im Homogenat und subzellulären Fraktionen. Außerdem wurde die mikrosomale RNA isoliert und die 18 S und 28 S rRNA gelelektophoretisch abgetrennt und deren Verteilung und spezifische Aktivität gemessen. Darüberhinaus wurden mittels Sucrocedichtegradientenzentrifugation die Ribosomenprofile ermittelt und die spezifische Aktivität des Gesamtproteins der Polysomen nach ^{3}H-Leucin Injektion bestimmt.

Alle Messungen erfolgten vergleichend zwischen den Lebern junger ausgewachsener (3 - 5 Monate) und alter weiblicher Wistar II - Ratten (28 - 34 Monate).

7.1. LEBERGEWICHT UND ANTEIL DES LEBERGEWICHTES AM KÖRPERGEWICHT

In der Tabelle 1 ist das Leber-Feuchtgewicht aufgeführt und in der Tabelle 2 der Anteil des Leber-Feuchtgewichtes am Gesamtkörpergewicht. Wie man sieht, ist das Lebergewicht der alten Ratten um 3o% höher als das der jungen Ratten; der Anteil am Gesamtkörpergewicht ist aber bei beiden Altersgruppen etwa gleich groß.

T a b e l l e 1: Leber-Feuchtgewicht

Das Gewicht der Lebern wurde bestimmt, nachdem die Ratten 16 Stunden ohne Futter gehalten wurden, bei uneingeschränkter Möglichkeit Wasser aufzunehmen.

3 - 5 Monate n = 27	5,42 g s = o,66 g
28 - 34 Monate n = 21	7,13 g s = o,71 g

T a b e l l e 2: Anteil des Leber-Feuchtgewichtes am Gesamtkörpergewicht

3 - 5 Monate n = 27	2,61 % s = o,27 %
28 - 34 Monate n = 21	2,39 % s = o,23 %

7.2. PROTEINGEHALT

T a b e l l e 3 zeigt den G e s a m t - P r o t e i n - G e h a l t des Leberhomogenates und der subzellulären Fraktionen, bezogen auf 1 g Leber-Feuchtgewicht.
Im Homogenat, postnuklearen und postmitochondrialen Überstand zeigt die Gruppe der alten Ratten einen im Mittel um etwa 18% reduzierten Gehalt an Gesamt-Protein gegenüber den jungen Wistar-Ratten. In der Mikrosomenfraktion beträgt der Unterschied sogar 23%.

T a b e l l e 3: Gesamt-Protein-Gehalt (mg/1g Leber-Feuchtgewicht)

	3 - 5 Monate n = 27	28 - 34 Monate n = 21	
Homogenat	172,2 mg s = 4,8 mg	141,9 mg s = 8,1 mg	p< o,ool
postnuklearer Überstand	141,6 mg s = 8,4 mg	115,8 mg s =1o,3 mg	p< o,ool
postmitochondrialer Überstand	129,1 mg s = 7,2 mg	1o5,2 mg s = 8,3 mg	p< o,ool
Mikrosomen	3,84 mg s = o,34 mg	2,97 mg s = o,45 mg	p< o,ool

7.2.1. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DES PROTEINS

Die spezifische Aktivität des Gesamt-Proteins nach ^{3}H - Leucin Gabe in den einzelnen Fraktionen ist in der Tabelle 4 wiedergegeben.

Die alten Ratten haben im Homogenat, postnuklearen und postmitochondrialen Überstand, sowie in der mikrosomalen Fraktion eine um 18,5% - 19,5% niedrigere spezifische Aktivität als die jungen, ausgewachsenen Ratten.

Tabelle 4: Spezifische Aktivität des Gesamt-Proteins

(cpm/1 mg)

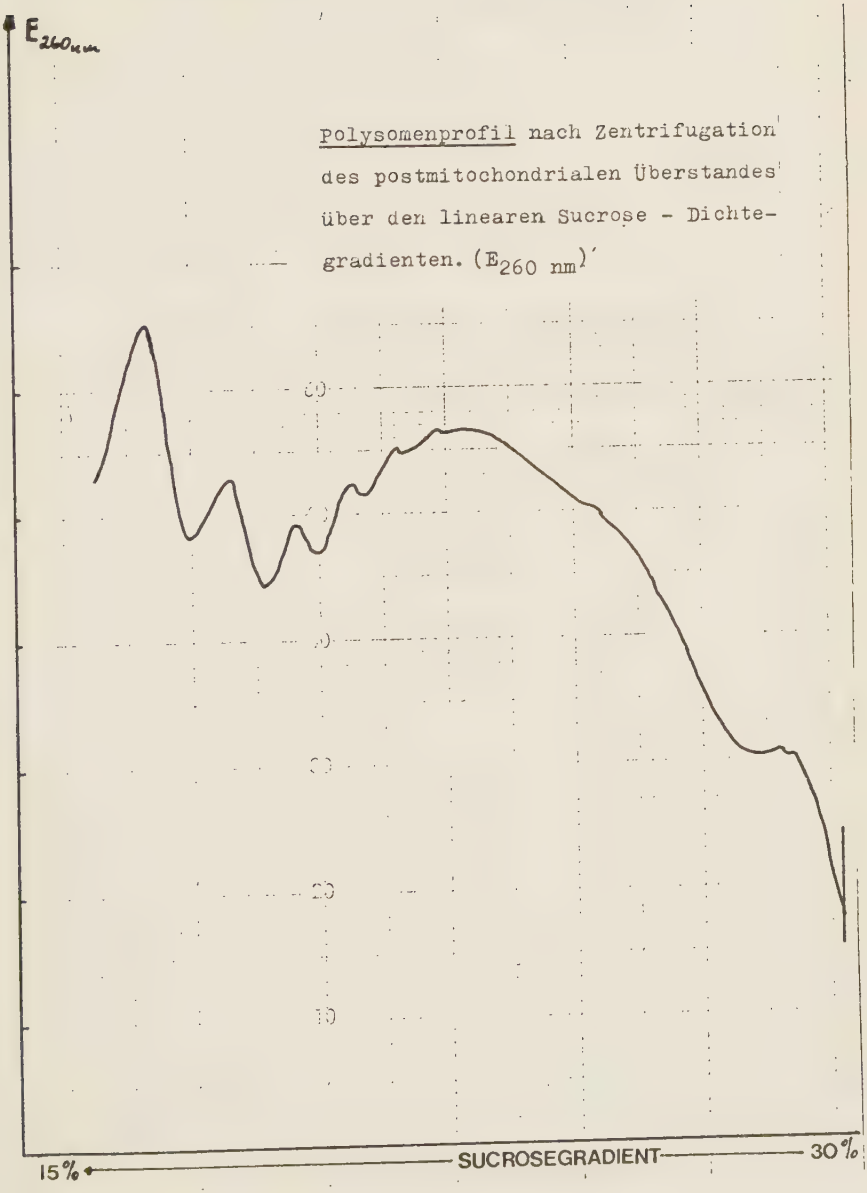
	3 - 5 Monate n = 18	28 - 34 Monate n = 15	
Homogenat	341 s = 3o	278 s = 41	p< o,ool
postnuklearer Überstand	338 s = 24	277 s = 27	p< o,ool
postmito-chondrialer Überstand	344 s = 25	277 s = 34	p< o,ool
Mikrosomen	728 s = 41	592 s = 28	p< o,ool

7.2.2. VERTEILUNG VON MONOSOMEN/DISOMEN UND POLYSOMEN

Tabelle 9 zeigt die Verteilung von Monosomen/Disomen und Polysomen.
Der Anteil der beiden Fraktionen am Gesamtribosomenprofil ist bei jungen und alten Ratten etwa gleich groß.

Tabelle 9: Verteilung von Monosomen/Disomen und Polysomen.

	3 - 5 Monate n = 18	28 - 34 Monate n = 15	
Monosomen/ Disomen	32,8% s = 4,1%	34,0% s = 4,4%	NS
Polysomen	67,2% s = 4,1%	66,0% s = 4,4%	NS



Polysomenprofil nach Zentrifugation des postmitochondrialen Überstandes über den linearen Sucrose - Dichtegradienten. ($E_{260\ nm}$)

7.2.3. PROTEINGEHALT UND SPEZIFISCHE AKTIVITÄT DES PROTEINS DER POLYSOMEN

In T a b e l l e 5 ist der Gesamt-Protein-Gehalt der Polysomenfraktion, sowie deren spezifische Aktivität nach ^{3}H - Leucin Injektion dargestellt. Die alten Ratten haben in der Polysomenfraktion einen um 38% höheren Gesamt-Protein-Gehalt als die jungen Ratten.
Dagegen ist die spezifische Aktivität des Gesamtproteins der Polysomenfraktion bei den alten Ratten um etwa 25% erniedrigt gegenüber den jungen Ratten.

T a b e l l e 5: Gesamt-Protein-Gehalt der Polysomen und die spezifische Aktivität des Gesamtproteins.

	3 - 5 Monate n = 27	28 - 34 Monate n = 21	
Gesamtprotein-Gehalt (mg/o,5ml)	o,13 s = o,o2	o,18 s = o,o3	p< o,ool
Spezifische Aktivität (cpm/1 mg)	2o83 s = 172	1557 s = 178	p< o,ool

7.3. RIBONUKLEINSÄURE - GEHALT

In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse der G e s a m t-R N A-Gehaltsbestimmung im Homogenat und den verschiedenen subzellulären Fraktionen zusammengefaßt.
Die alten Ratten haben verglichen mit den jungen Ratten im Homogenat, postnuklearen und postmitochondrialen Überstand einen erhöhten Gesamt-RNA-Gehalt von 19% - 22%. In der Mikrosomenfraktion fand sich dagegen kein deutlicher Unterschied.

T a b e l l e 6: Gesamt-RNA-Gehalt
(mg/1g Leber-Feuchtgewicht)

	3 -5 Monate n = 27	28 - 34 Monate n = 21	
Homogenat	1o,4 mg s = o,7 mg	12,7 mg s = 1,1 mg	p< o,oo1
Postnuklearer Überstand	9,3 mg s = o,6 mg	11,3 mg s = o,7 mg	p< o,oo1
Postmitochondrialer Überstand	8,8 mg s = o,5 mg	1o,5 mg s = o,8 mg	p< o,oo1
Mikrosomen	3,6 mg s =o,34 mg	3,8 mg s =o,24 mg	p< o,o25

7.3.1. SPEZIFISCHE AKTIVITÄT DER GESAMT-RIBONUKLEINSÄURE

T a b e l l e 7 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen der s p e z i f i s c h e n A k t i v i t ä t der G e s a m t-R N A im Homogenat und den verschiedenen subzellulären Fraktionen.

Die spezifische Aktivität der Gesamt - RNA ist bei den alten Tieren gegenüber den jungen, ausgewachsenen Tieren signifikant erhöht. Im einzelnen zeigt sich folgendes Bild: im Homogenat 25,9%, im postnuklearen Überstand 25,6% und im postmitochondrialen Überstand 18,3%. In der Mikrosomen-Fraktion fand sich kein Unterschied.

T a b e l l e 7: Spezifische Aktivität der Gesamt-RNA (cpm/1 µg)

	3 - 5 Monate n = 12	28 - 34 Monate n = 11	
Homogenat	181 s = 5	228 s =23	p< 0,001
postnuklearer Überstand	160 s = 9	201 s =20	p< 0,001
postmitochondrialer Überstand	158 s =15	187 s =26	p< 0,005
Mikrosomen	164 s =17	164 s =17	NS

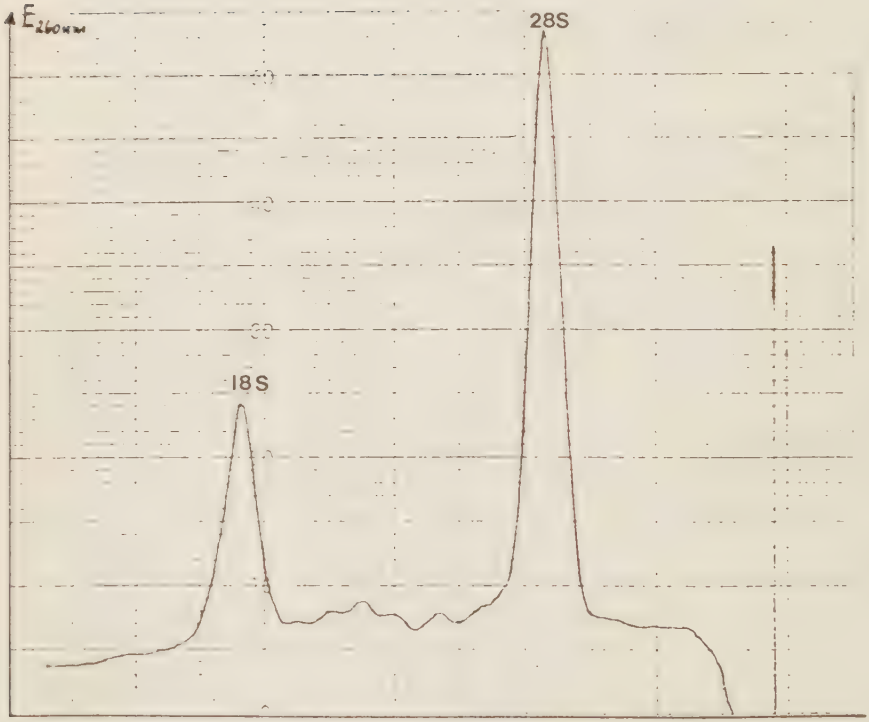
7.3.2. VERTEILUNG UND SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN VON 18 S UND 28 S RIBOSOMALER RIBONUKLEINSÄURE

Die Verteilung und die spezifische Aktivität von 18 S und 28 S rRNA nach Polyacrylamid - SDS - Gelelektrophorese ist in Tabelle 8 dargestellt. Die alten Ratten zeigen einen gering erhöhten Anteil an 28 S rRNA gegenüber den jungen, ausgewachsenen Ratten. In der spezifischen Aktivität konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 8: Verteilung und spezifische Aktivität der 18 S und 28 S rRNA.

	3 - 5 Monate	28 - 34 Monate	
18 S	32,3% s = 1,7%	3o,6% s = o,7%	p< o,oo5
spezifische Aktivität	5748 s = 382	5811 s = 244	NS
28 S	67,7% s = 1,7%	69,4% s = o,7%	p< o,oo5
spezifische Aktivität	6319 s = 536	6588 s = 672	p< o,25

Absorptionskurve eines Polyacrylamid-Gels nach der beschriebenen elektrophoretischen Trennung von 18S und 28S rRNA.



7.4. VERHÄLTNIS VON RIBONUKLEINSÄURE ZU PROTEIN

Die Tabelle 1o gibt den Quotienten $\frac{\text{RNA}}{\text{Protein}}$ wieder.

Er ist bei den alten Ratten, verglichen mit den jungen Ratten signifikant erhöht.

Tabelle 1o: $\frac{\text{RNA}}{\text{Protein}}$

	3 - 5 Monate	28 - 34 Monate
Homogenat	o,o6o	o,o89
postnuklearer Überstand	o,o66	o,o98
postmitochondrialer Überstand	o,o68	o,o99
Mikrosomen	o,938	1,279

8. D I S K U S S I O N

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen die von MEDVEDEV und ORGEL formulierte Theorie, wonach die Proteinbiosynthese im Alter gestört ist, zu unterstützen. Die Untersuchungen haben ergeben, daß der Gesamtproteingehalt der Leber bei den sehr alten Ratten-Weibchen (28 - 34 Monate) im Vergleich zu den jungen, ausgewachsenen Ratten (3 - 5 Monate) um etwa 2o % reduziert ist. Gleiches gilt für die spezifische Aktivität des Gesamtproteins nach ^{3}H - Leucin Gabe. Dies bedeutet, daß bei den alten Tieren die Proteinbiosynthese quantitativ vermindert ist oder daß der Abbau der Proteinmoleküle schneller erfolgt. Die Ergebnisse der Untersuchung zur Proteinsynthese an den Polysomen scheinen dieses Problem zu klären. Die vergleichenden Messungen der in vivo - Proteinbiosynthese in der durch Sucrosegradienten abgetrennten Polysomenfraktion zeigen, daß die Abnahme des Proteingehaltes auf einer verminderten Proteinsyntheseleistung an den Polysomen der alten Ratten beruht. Die spezifische Aktivität des Proteins der Polysomen, dem eigentlichen Ort der Proteinbiosynthese, ist bei den alten Ratten um etwa 25 % niedriger als bei den jungen Ratten. Der multienzymgesteuerte Apparat der Proteinbiosynthese scheint im Alter bei weitem nicht mehr die Leistungsfähigkeit der Jugend zu besitzen. Diese in vivo gefundenen Ergebnisse stimmen mit der in vitro gezeigten Abnahme der Proteinsynthese alter Tiere

überein. Es konnte gezeigt werden, daß die zellfreie Proteinsynthese im Muskel (Breuer und Florini, 1965 [4] Florini, 1969 [7]) im Gehirn (Johnson und Belytschko, 1969 [18] Johnson 1968 [17] , Murthy und Rappoport 1965 [28]) und in der Leber (Mainwaring 1968 [23] , Mainwaring 1969 [24] , Hrachovec 1971 [15] , Layman et al., 1976 [19]) vermindert ist, wenn alte Tiere mit jüngeren Tieren im Versuch verglichen wurden. Mainwaring zeigte, daß die zellfreie Proteinbiosynthese der Leber von 3o Monate alten Mäusen signifikant niedriger ist, als die in vitro Proteinsynthese durch 5 Monate alte Mäuse. Hrachovec fand eine ähnliche Abnahme in der in vitro Proteinsynthese bei der Rattenleber. Hrachovec vermutet, daß die Abnahme der Proteinsynthese der Leber verursacht wird durch Veränderungen im endoplasmatischen Retikulum oder durch Akkumulation von Inhibitoren am endoplasmatischen Retikulum mit zunehmendem Alter. Auch Layman fand eine deutlich verminderte zellfreie Proteinsynthese der Rattenleber, jedoch muß einschränkend erwähnt werden, daß er in seinen Experimenten Vergleiche zwischen heranwachsenden (1 Monat) und ausgewachsenen Ratten (18 Monate) vornahm, deren Bedeutung für Altersveränderungen aber fragwürdig ist, da die mit dem Wachstum der jungen Tiere im Zusammenhang stehenden Prozesse die Ergebnisse stark beeinflussen werden. Daß die Abnahme der Proteinbiosynthese keinesfalls durch eine altersbedingte Änderung der freien Aminosäuren erklärt werden kann, haben frühere Untersuchungen ergeben. Es konnte gezeigt werden, daß sich der Aminosäurepool während des Alterns in der Leber nicht verändert(Rao, 1971 [32] ; Du, 1972 [6]).

Für eine geringere Leistungsfähigkeit der Polysomen spricht auch die Berechnung des Quotienten Ribonukleinsäure/Protein, der bei den alten Ratten signifikant erhöht ist, was einerseits für eine schlechtere Ausnutzung der transkribierten Ribonukleinsäure spricht, andererseits aber auch auf einen Kompensationsmechanismus hindeutet. Es ist möglich, daß die Zelle eine qualitativ veränderte und quantitativ verminderte Proteinsynthese im Sinne des Modells von JACOB und MONOD [16] durch Derepression der RNA - Synthese beantwortet, um dadurch eine Kompensation zu versuchen. Diese Möglichkeit wird durch die vorliegende Arbeit dadurch noch gestützt, daß im Homogenat sowohl der Gesamt-RNA-Gehalt, als auch die spezifische Aktivität der Gesamt-RNA in der Leber der alten Ratten um über 2o % höher ist als bei den jungen Ratten. Da sich dieser signifikante Unterschied in der mikrosomalen Fraktion nicht finden läßt, deutet es darauf hin, daß die Synthese der ribosomalen Ribonukleinsäure, die den weit größten Teil der mikrosomalen Ribonukleinsäure ausmacht, im Alter nicht verändert ist. Hierfür spricht auch, daß die Verteilung und die Synthese von 18 S und 28 S ribosomaler Ribonukleinsäure zwischen jungen und alten Ratten nicht signifikant verändert ist, was durch Ergebnisse der Polyacrylamidgel-Elektrophorese und die Berechnung der spezifischen Aktivität dieser beiden ribosomalen Ribonukleinsäuren gezeigt wird. Die rRNA zeigt nach der vorliegenden Untersuchung weder quantitativ noch qualitativ eine Veränderung und scheint für den Alterungsprozeß keine Rolle zu spielen.

Die Veränderungen in der Gesamt - Ribonukleinsäure sind also entweder durch eine erhöhte messenger - RNA - Synthese verursacht worden, was für den schon erwähnten Kompensationsmechanismus sprechen würde, oder durch eine vermehrte t - RNA - Synthese. Es können auch beide RNA - Typen erhöht sein.

Daß nun in der vorliegenden Arbeit bei den alten Tieren dennoch eine geringere Proteinsynthese beobachtet wurde, obwohl die m-RNA bei ihnen wahrscheinlich gar in erhöhtem Maße synthetisiert wird, kann verschiedene Ursachen haben.

Erstens ist es denkbar, daß die m-RNA falsch transkribiert wurde, was allein vielleicht schon eine verminderte Proteinbiosynthese zur Folge haben könnte. Wahrscheinlich würde es aber zur Synthese von falschen Proteinmolekülen ("Nonsense-Proteine") kommen. Wenn diese fehlerhaft synthetisierten Proteine selbst Enzyme sind, die an der Übersetzung des genetischen Codes beteiligt sind (z.B. RNA-Polymerasen, Initiationsfaktoren, Elongationsfaktoren etc.), so wird dies eine verminderte Proteinbiosynthese zur Folge haben.

Eine zweite Möglichkeit wäre die, daß die m-RNA normal gebaut, d.h. richtig transkribiert wurde. In diesem Falle ließe sich die beobachtete verminderte Proteinsynthese ausschließlich durch Störungen auf der enzymatischen Ebene der Proteinbiosynthese erklären. Sekundär eingetretene Veränderungen am Enzymmolekül oder Veränderungen z.B. im pH - Bereich oder im Elektrolythaushalt der Zelle,ganz allgemein also Störungen der Homöostase, für die die Zelle im Alter anfälliger zu sein scheint, könnten die Aktivität der Enzyme erheblich vermindern.

Natürlich könnten sich die beiden genannten Ursachen auch überschneiden und gemeinsam als Erklärung für die abnehmende Proteinsynthese im Alter von Bedeutung sein.

Als Ursache für eine verminderte Proteinbiosynthese kommen möglicherweise auch Inhibitoren des Zytosols, die im Alter auftreten, in Betracht.

Für das Vorhandensein defekter, an der Proteinbiosynthese beteiligter Moleküle - die nach Orgel's Theorie für den Alterungsprozeß verantwortlich sind - von Inhibitoren oder sonstiger Faktoren, die einen hemmenden Einfluß auf die Funktion der Polysomen haben, sprechen die Ergebnisse der Analyse über die Verteilung von Monsomen/Disomen und Polysomen im postmitochondrialen Überstand von jungen und alten Ratten. In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen den beiden betrachteten Altersgruppen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung festgestellt werden. Betrachtet man dieses Ergebnis gemeinsam mit dem Ergebnis zur Proteinbiosynthese, so läßt sich sagen, daß bei beiden Gruppen die messenger-RNA zwar mit Ribosomen besetzt wird, die Translation an den Polysomen aber bei den alten Ratten vermindert ist was durch Messungen der geringeren spezifischen Aktivität des Proteins in der Polysomenfraktion der alten Ratten gezeigt werden konnte.

Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeit zeigen deutlich eine verminderte Leistungsfähigkeit der Polysomen bei der Proteinbiosynthese im Alter. Dies könnte eine Ursache für den Alterungsprozeß sein.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Die in vivo-Untersuchungen, vergleichend an der Leber ausgewachsener junger (3-5 Monate) und alter (28-34 Monate) Wistar II - Rattenweibchen, ergab folgende Ergebnisse:

(1) Das Leber-Feuchtgewicht der alten Ratten ist um 30% höher als das der jungen Tiere.
Der Anteil des Lebergewichtes am Gesamtkörpergewicht ist aber bei beiden Altersgruppen gleich groß.

(2) Gegenüber den jungen Ratten zeigt die Gruppe der alten Tiere im Homogenat, postnuklearen und postmitochondrialen Überstand einen um 18% reduzierten Gehalt an Gesamt-Protein, bezogen auf 1g Leber-Feuchtgewicht (mg Protein/1g Leber-Feuchtgewicht). In der Mikrosomenfraktion beträgt der Unterschied sogar 23%.

(3) Im Homogenat und den subzellulären Fraktionen ist nach ^{3}H-Leucin Gabe die spezifische Aktivität (cpm/1 mg) des Gesamt-Proteins der alten Ratten um 18,5% - 19,5% erniedrigt.

(4) Das durch Sucrose-Dichtegradient aus dem postmitochondrialen Überstand ermittelte Ribosomenprofil zeigt, daß der Anteil der zwei Fraktionen Monosomen/Disomen und Polysomen am Gesamtprofil in beiden Altersgruppen gleich groß ist.

(5) Bei den alten Ratten ist die spezifische Aktivität des Gesamt-Proteins (cpm/1 mg) in der Polysomenfraktion, dem Ort der Proteinsynthese, um 25% niedriger gegenüber den jungen Tieren.

(6) Im Homogenat, postnuklearen und postmitochondrialen Überstand haben die alten Tiere, einen 20% höheren Gesamt-RNA-Gehalt als die jungen Ratten. In der Mikrosomenfraktion fand sich dagegen kein signifikanter Unterschied.

(7) Nach der Gabe von ^{14}C-Orotsäure ist die spezifische Aktivität der Gesamt-RNA (cpm/1 µg) bei den alten Ratten im Homogenat, postnuklearen und postmitochondrialen Überstand um 18% erhöht gegenüber den jungen, ausgewachsenen Ratten. In der Mikrosomenfraktion fand sich kein Unterschied.

(8) Die Bestimmung der Verteilung und spezifischen Aktivität von 18S und 28S rRNA nach Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese ergibt bei den alten Tieren einen gering erhöhten Anteil an 28S rRNA. In der spezifischen Aktivität konnte kein Unterschied festgestellt werden.

(9) Der Quotient aus Gesamt-RNA durch Gesamt-Protein ist bei den alten Ratten signifikant höher als bei den jungen Tieren.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) ANDREW,W.: Cellular changes with age. ed. by THOMAS Springfield (Ill.) (1952)

(2) BISHOP,D.H.L., CLAYBROOK,J.R., SPIEGELMAN,S.: Elektrophoretic separation of viral nucleic acids of polyacrylamid gels. J.Mol.Biol. 26: 373 (1967)

(3) BUETOW,D.E.: Cellular content and cellular proliferation changes in the tissue and organs of the aging mammal. In: CAMERON,J.L., THRASHER,J.D.: Cellular and molecular renewal of the mammalian body. p 87, Academic Press, New York (1971)

(4) BREUER,C.B., FLORINI,J.R.: Amino acid incorporation into protein by cell-free systems from rat skeletal muscle. IV. Effects of animal age, androgens and anabolic agents on activity of muscle ribosomes. Biochemistry 4: 1544 (1965)

(5) COMFORT,A.: Physiology, homeostasis and ageing. Gerontologia 14: 224 (1968)

(6) DU,J.T., HOFFMANN,J.L., LANG,C.A.: Leucine pool size in liver and heart of mature and old mouse. The gerontologist 12: 27 (1972)

(7) FLORINI,J.R.: Control of ribonucleic acid and protein synthesis in muscle. Proc. 8th. int. congr. geront. 1: 343 (1969)

(8) GSELL,D.: In: Die Umwelt der Versuchstiere und ihre Standardisierung im biologischen Test. hsg.WEIHE,W.H. Bern: 114 (1963)

(9) HAGEDORN,E., WEHNER,R.: Allgemeine Zoologie, Thieme - Verlag, Stuttgart (1974)

(10) HARBERS,E.: Nucleinsäuren. Thieme - Verlag, Stuttgart (1975)

(11) HASELKORN,R., ROTHMAN - DENES,L.B.: Protein synthesis. Ann.Rev.Biochem. 42: 397 (1973)

(12) HAYFLICK,L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp.Cell Res. 37: 614 (1965)

(13) HAYFLICK,L.: The biology of human aging. Am.J.med. Sci. 265: 433 (1973)

(14) HAYFLICK,L., MOORHEAD,P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp.Cell Res.25: 585 (1961)

(15) HRACHOVEC,J.R.: The effect of age on tissue protein synthesis. Gerontologia 17: 75 (1971)

(16) JACOB, F., MONOD, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins J.Mol.Biol. 3: 318 (1961)

(17) JOHNSON, T.C.: Cell-free protein synthesis by mouse brain during early development. J.Neurochem. 15: 1189 (1968)

(18) JOHNSON, T.C., BELYTSCHKO, G.: Alteration in microsomal protein synthesis during early development of mouse brain. Proc. Nat. Acad. Sci. US 62: 844 (1969)

(19) LAYMAN, D.K., RICCA, G.A., RICHARDSON, A.: The effect of age on protein synthesis and ribosome aggregation to messenger RNA in rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 173:246 (1976)

(2o) LOENING, U.E.: The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by poly-acrylamid-gel elektrophoresis. Biochem. J. 1o2: 251 (1967)

(21) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR,A.L., RANDALL,R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193: 265 (1951)

(22) MAHIN,D.T., LOFBERG,R.T.: A simplified method of sample preparation for determination of tritium, carbon-14 or sulfur-35 in blood or tissue by liquid scintillation counting. Anal. Biochem. 16 : 5oo (1966)

(23) MAINWARING,W.I.P.: Changes in the ribonucleic acid metabolism of aging mouse tissues with particular reference to the prostate gland. Biochem. J. 11o : 79 (1968)

(24) MAINWARING,W.I.P.: The effects of age on protein synthesis in mouse liver. Biochem. J. 113 : 869 (1969)

(25) MEDVEDEV,Z.A.: Aging at the molecular level. In: Biological aspects of aging. ed. by SHOCK,N.W., Columbia University Press New York p. 255 (1962)

(26) MEDVEDEV,Z.A.: The nucleic acids in development and aging. Adv. in Gerontol. Res. 1, p. 181 ed. by STREHLER,B.L., Academ.Press, New York (1964)

(27) MEDVEDEV,Z.A.: Error theories of ageing. In: Alternstheorien hsg.v. PLATT,D., Schattauer-Verlag Stuttg. - New York: 37 (1976)

(28) MURTHY,M.R., RAPPOPORT,D.A.: Biochemistry of the developing rat brain. V. Cell-free incorporation of L- I- ^{14}C - leucin into microsomal protein. Biochim. Biophys. Acta 95 : 121 (1965)

(29) ORGEL,L.E.: The maintainance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. Proc.Nat.Acad.Sci.US 49 : 517 (1963)

(3o) PATTERSON; GREENE: Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. Analyt. Chem. 37 : 854 (1965)

(31) PERRY,R.P.: The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA, Proc.Nat.Acad.Sci.US 48 : 2179 (1962)

(32) RAO,K.L., PATNAIK,B.K.: Alterations in the RNA, protein and free amino acid level of the liver of the garden lizard, calotes versicolor, during ageing and partial hepatectomy. Exp.Geront. 6 : 397 (1971)

(33) ROSENBAUER,K.A.: Entwicklung, Wachstum, Mißbildungen und Alter bei Mensch und Tier. Bücher der Zeitschrift Naturwissenschaftliche Rundschau, wissenschaftliche Verlags GmbH, Stuttg. (1969)

(34) SCHNEIDER,W.C.: In: Methods in Enzymology III p.68o
Academ.Press New York (1957)

(35) SCOTT,J.F., FRACCASTORO,A.P., TAFT,E.B.:
Studies in histochemistry: I. Determination of
nucleic acids in microgram amounts of tissue.
J. Histochem. Cytochem. 4 : 1 (1956)

(36) SIEKEVITZ, P.: Uptake of radioactive alanine in
vitro into the proteins of rat liver fractions.
J. Biol. Chem. 195 : 549 (1952)

(37) STEWART,P.R., LETHAM,D.S.: The ribonucleic acids.
Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg 1977

(38) TSANEV,R., MARKOV,G.G.: Substances interfering
with spectrophotometric estimation of nucleic
acids and their elimination by the two-wavelength
method. Biochim. Biophys. Acta 42 : 442 (196o)

Herrn Professor Dr. Siegfried Hollmann gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, seine hilfreichen Anregungen und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Hans Reinauer danke ich für die Übernahme des Korreferates.

LEBENSLAUF

03.12.46	geboren als 4. Kind der Eheleute Fritz und Amanda Schneider in Holzwickede
16.04.53	Einschulung in die katholische Aloysius-Schule in Holzwickede
17.03.61	Volksschulabschluß
01.04.61	Lehranfang als kaufm. Lehrling bei der "Westfälischen Rundschau" in Dortmund
21.03.64	Kaufmannsgehilfenbrief
22.04.65	Eintritt in die Berufsaufbauschule in Dortmund
29.09.66	Fachschulreifezeugnis
01.11.66	Eintritt in das Westfalen-Kolleg in Paderborn
20.01.69	Reifezeugnis
01.04.69 -15.02.71	Drei Semester Chemiestudium an der Universität Dortmund
01.04.71	Beginn der Praktikantenzeit in der Marien-Apotheke in Dortmund
28.03.73	Zeugnis über die pharmazeutische Vorprüfung
01.04.73	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Münster
April 76	Pharmazeutisches Staatsexamen
19.08.76	Erteilung der Approbation als Apotheker
01.10.76	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf
01.07.77	Beginn der Promotionsarbeit

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen